UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

“BIOMASA DE *Chlorella* SP. DULCEACUÍCOLA COMO NUTRIENTE DE CULTIVO SÓLIDO PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Pleurotus ostreatus*”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título**:**

BIÓLOGO

AUTOR:

MACHUCA VALAREZO LUIS ENRIQUE

TUTORA:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

"BIOMASA DE *Chlorella* SP. DULCEACUÍCOLA COMO NUTRIENTE DE CULTIVO SÓLIDO PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Pleurotus ostreatus*"

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título**:**

BIÓLOGO

AUTOR:

MACHUCA VALAREZO LUIS ENRIQUE

TUTORA:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Machuca Valarezo Luis Enrique** 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 **15 de julio de 2024**

Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc

DIRECTOR/A DE CARRERA

Blga. Mayra Cuenca Zambrano, M.Sc.

PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.

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/A DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Manifiesto que, la responsabilidad por las ideas, contenido y resultados plasmados en este Trabajo de Integración Curricular pertenecen exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual del mismo le corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Machuca Valarezo Luis Enrique

C.I.: 0928778893

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, **"Biomasa de *Chlorella* sp. dulceacuícola como nutriente de cultivo sólido para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus***", elaborado por **Machuca Valarezo Luis Enrique**, estudiante de la Carrera de **Biología**, Facultad de **Ciencias del Mar** de la **Universidad Península de Santa Elena**, previo a la obtención del título de **"Biólogo"**. Me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos. Razón por la cual, apruebo en todas sus partes encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

La Libertad, 8 de julio de 2024

Atentamente

Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.
DOCENTE TUTOR
C.I.0201234044

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular "**Biomasa de *Chlorella* Sp. dulceacuícola como nutriente de cultivo sólido para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus***", elaborado por **Machuca Valarezo Luis Enrique**, 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. Mayra Cuenca Zambrano M.Sc

DOCENTE DE ÁREA

C.I. 1712887767

Dedicatoria

A mi Madre y Padre, cuya presencia ha estado desde el comienzo. Siendo la razón de mi esfuerzo por seguir adelante sobre cualquier adversidad.

A mis hermanos Sebastián Gonzalo y Juan José, a quienes observo para recordarme constantemente que no estoy solo en esta lucha por algo mejor.

A mis tías, abuelito y mi difunto tío, quienes me han apoyado emocional y económicamente, siempre deseándome lo mejor y animándome a ser lo mejor en lo que me interesa.

A mis amigos, colegas y compañeros de trabajo, especialmente: Santiago Yugcha, Alexander Vergara, Ambar Castillo, Luis Arauz, Gabriela Ortega, Samantha Cañar, Marcos Vega, Rebeca Cevallos y Fabricio Briones. Quienes han sido el apoyo emocional durante todo este episodio de mi vida. Su paciencia, confianza y amabilidad han hecho de mis días universitarios muy entretenidos.

A mis amigos de toda la vida y amigos recientes: Kevin Zurita, Brenda Regalado, Henry Martínez, Brandon Jiménez, Luis Sánchez, Josué Masabanda, Jhosua Salazar y Anghelo Palma. Por sus consejos y tiempo para escucharme cuando pudieron.

Agradecimientos

Un agradecimiento a las autoridades de la Universidad Estatal Península de Santa Elena y el personal de la Facultad de Ciencias del Mar por su apoyo y disposición al posibilitar la culminación este trabajo de titulación, en especial al director de la carrera de biología, el Ing. Jimmy Villón M.Sc.

Un agradecimiento especial a la Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D. cuyas enseñanzas permitieron la correcta ejecución y redacción de la presente investigación.

Un agradecimiento especial a la Blga. Sara Ríos Tomalá, cuya guía técnica de cultivos y procesos bioquímicos, han permitido sobrellevar varios de los desafíos presentes en las metodologías empleadas.

INDICE

Introducción I
Justificación IV
1. Objetivos 1
1.1. General 1
1.2. Específicos 1
2. Hipótesis 1
2.1. Alternativa 1
3. Marco teórico 2
3.1. Chlorella 2
3.2. Generalidades de Chlorella 2
3.3. Formas de Nutrición 3
3.4. Cultivos de Chlorella 4
3.4.1. Fases de crecimiento 4
3.4.2. Condiciones de cultivo generales 5
3.4.3. Medios de cultivo 6
3.4.4. Nitrogen-Phosphorus-Potassium (N.P.K.) 6
3.4.5. Cultivo heterótrofo 6
3.5. Cuantificación de macromoléculas por espectrofotometría 7
3.5.1. Espectrofotómetro 7
3.5.2. Curvas de calibración 8
3.5.3. Método de Biuret 9
3.5.4. Método SPV (Sulphu-Phospho-Vanillin) 10
3.5.5. Método Ácido sulfúrico UV-VIS 10
3.6. Micología 10
3.6.1. Pleurotus ostreatus 10
***3.6.2.* Nutrientes esenciales** 11
***3.6.3.* Medios de cultivo** 11
***3.6.4.* Senescencia micelial** 11
4. Marco metodológico 13
4.1. Obtención de muestras biológicas 13
4.1.1. Mantenimiento de la microalga Chlorella sp 13
4.1.2. Mantenimiento del hongo Pleurotus ostreatus 14
4.2. Curva de crecimiento 14
4.3. Masificación de la microalga 15
4.4. Composición bioquímica 17

4.4.1. Preparación de la muestra 17
4.4.2. Eliminación de pigmentos 17
4.4.3. Lisado/Disrupción celular 17
4.4.4. Equipos y Formulas 18
4.4.5. Cuantificación de carbohidratos (Método Ácido sulfúrico UV-VIS) 18
4.4.6. Cuantificación de lípidos (Método de Sulfo-Phospho-Vanilin "S-P-V") 19
4.4.7. Cuantificación de proteínas (Método de Biuret) 19
5.5. Implementación de la biomasa microalgal 20
5.5.1. Preparación de Medio de cultivo sólido 20
5.5.2. Caracterización del crecimiento micelial 22
5.5.3. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento 23
6. Resultados 25
6.5. Cultivo heterótrofo de la microalga *Chlorella* sp. 25
6.5.1. Rendimiento del medio de cultivo 25
6.5.2. Productividad celular y Tasa de crecimiento 26
6.6. Composición bioquímica de la biomasa 26
6.7. Caracterización del crecimiento micelial 27
6.7.1. Crecimiento 27
6.7.2. Morfología del micelio 31
7. Discusión 34
7.1. Cultivo de la microalga *Chlorella* sp. 34
7.2. Composición bioquímica de la biomasa de microalgas 36
7.3. Implementación de la biomasa de microalgas como nutriente de medio de cultivo 37
7.3.1. Velocidad de crecimiento micelial 37
7.3.2. Morfología del micelio 38
8. Conclusiones 40
9. Recomendaciones 41
Referencias 42
ANEXOS 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación taxonómica del género Chlorella……..……...……...2

Figura 2. *Chlorella* sp. observada a 1000x (100x Objetivo * 10x ocular) …….…….…….....2

Figura 3. Fases de la reproducción asexual en Chlorella…….……..…...3

Figura 4. Reacción química del reactivo con una muestra de proteínas……...……...9

Figura 5. Representación gráfica del sistema de masificación ……..16

Figura 6. Esquema del proceso de preparación de cultivos y caracterización micelial…....22

Figura 7. Tipos de elevación de colonias "Plano, Elevado, Convexo, Pulvinante y Umbo"

…….23

Figura 8. Morfología del micelio de *Pleurotus. ostreatus*……...…….……...23

Figura 9. Gráfica de la curva de crecimiento del cultivo heterótrofo de Chlorella…..……..25

Figura 10. Gráfica del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*……..……27

Figura 11. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en el grupo tratamiento……..……..…….……28

Figura 12. Comparación del grupo tratamiento 0.5g de biomasa microalgal vs Grupo control Medio estándar (st) …….……29

Figura 13. Comparación del grupo tratamiento 0.5g de biomasa microalgal vs Grupo control medio sin nutrientes (nt). ……29

Figura 14. Prueba de diferencia significativa honesta de Tukey sobre el grupo 0,5 g de biomasa microalgal vs Medio estándar (st) ……...……30

Figura 15. Morfología del micelio de *Pleurotus ostreatus* ……...……33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica de Chlorella en condiciones heterótrofas…….26

Tabla 2. Morfología del crecimiento micelial en el grupo control …….……31

Tabla 3. Morfología del crecimiento micelial en el grupo tratamiento …….….32

Tabla 4. Comparación en la morfología del crecimiento micelial: 0.5g Biomasa de microalgas vs Medio estándar vs Medio sin nutrientes ……..…….…..33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de muestra del medio de cultivo…….53

Anexo 2 Cepa de *Chlorella* sp. en colonias a 1000x. ……..…53

Anexo 3. Prueba preliminar de agar de microalgas……..…53

Anexo 4. Cepa de *Pleurotus ostreatus en agar LMEA*. ……...……53

Anexo 5. Colorimetría de proteínas de microalgas por el protocolo de Biuret……54

Anexo 6 Realizando protocolo de carbohidratos totales ‘Ácido sulfúrico UV-VIS’……54

Anexo 7. Muestras colorimétricas del protocolo de lípidos totales ‘Sulphu-Phospho-Vanillin’……..54

Anexo 8 Conteo celular y monitoreo del pH en el medio de cultivo……..55

Anexo 9. Monitoreo del crecimiento micelial en el intervalo de 8 días de monitoreo……..55

Anexo 10. Registro de morfología del grupo control y el grupo tratamiento……55

Anexo 11. Curva de calibración de proteínas totales, protocolo de Biuret……56

Anexo 12. Curva de calibración de proteínas lípidos totales, protocolo de S.P.V……56

Anexo 13. Curva de calibración de carbohidratos totales, protocolo Sulfuric Acid UV-VIS…….56

Glosario

Término	**Significado**
Saprofítico	Organismos o microorganismos que se alimentan de materia orgánica en descomposición.
Heterótrofo	Organismos o microorganismos incapaces de producir su propio alimento, por lo que consumen materia orgánica de otros seres vivos o fuentes de carbono orgánicas.
Chlorophyta	División de las algas verdes
Dulceacuícola	Que pertenece a aguas dulces
Bioquímica	Ciencia que estudia la composición química o macromoléculas de seres vivos
Macromolécula	Moléculas de gran tamaño
Senescencia	Proceso de envejecimiento celular o deterioro de las funciones biológicas
Absorbancia	Medida que cuantifica la capacidad de absorber un compuesto o radiación
Cepa	Población de microrganismos de un solo género o especie
Fisiología	Relacionado a las funciones y procesos biológicos
Morfología	Estudio de la forma o estructura de un organimo
Micelio	Conjunto de hifas del cuerpo vegetativo de un hongo
Calibrador	Instrumento de medición longitudinal (cm o mm o pulgadas)
Cuvette	Recipiente pequeño utilizado en espectrofotometría, puede ser de cristal o cuarzo
Microalgas	Algas microscópicas, la mayoría siendo unicelulares
Intervalo	Rango de dos valores o puntos en una escala

Curva de calibración	Gráfico utilizado en espectrofotometría para determinar la concentración de una sustancia
Biomasa	Masa total de organismo en un volumen determinado
Colorimétrico	Sustancia cuya coloración indicar un efecto, concentración o soluto disuelto en un volumen determinado

Simbología Y Abreviaturas

Símbolo	**Significado**
µL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
Cel	Célula(s)
g	Gramos
mg	Miligramos
LMEA	Light Malt Extract agar (Agar de extracto de malta)
Nt	No nutriente (Sin nutrientes)
St	Estándar
$g*L^{-1}$	Gramos por litro
$g*ml^{-1}$	Gramos por mililitro

Resumen

La biomasa de microalgas del género Chlorella tienen una composición que varía significativamente dependiendo del medio de cultivo y de las condiciones ambientales a las que son sometidas. Condiciones que inducen comportamientos heterótrofos o autótrofos los cuales se utilizan dependiendo del objetivo de la biomasa. Por lo que se realizó un estudio cuyo propósito fue analizar la biomasa de *Chlorella sp* dulceacuícola como nutriente de medio de cultivo sólido para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*. Se desarrolló un cultivo heterótrofo de *Chlorella* sp a base del fertilizante N.P.K. suplementando con una fuente de carbono en la forma de extracto de malta. Medio de cultivo propuesto para analizar la composición bioquímica de la biomasa obtenida e implementarla en cultivos de *Pleurotus ostreatus* y compararlos con medios de cultivo convencionales. Se obtuvo como resultado un medio de cultivo con una productividad de 1.78E+6 células/mL/día y una biomasa compuesta de 20% lípidos, 47% proteínas y 19% carbohidratos. Al ser implementarla en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, produjo una velocidad de crecimiento micelial máxima de 9.66 mm/día en el medio de 0.5 g de biomasa de microalgas, siendo significativamente inferior medio estándar de 15.97 mm/día. Sin embargo, el medio propuesto demostró efectividad en la morfología del micelio. El cultivo de 0.5 g de biomasa de microalgas, mostró un 66.66% de probabilidad en coincidir con 3 características de un medio de cultivo estándar. Las características equivalentes obtenidas fueron: textura, densidad y tipo de crecimiento. Por lo tanto, la composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en medios heterótrofos, resulta en un nutriente alternativo y comparable a medios estándar para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo sólido.

Palabras clave: Medio de cultivo, *Chlorella* sp, Dulceacuícola, *Pleurotus ostreatus,* Biomasa, Composición bioquímica.

Abstract

The biomass of microalgae from the genus Chlorella has a composition that varies significantly depending on the culture medium and the environmental conditions to which they are subjected. Such conditions induce a heterotrophic or autotrophic behavior, which are used based on the biomass's purpose. Therefore, a study was conducted to analyze the biomass of freshwater *Chlorella* sp. as a solid-culture-medium nutrient for the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. Thus, a heterotrophic culture of *Chlorella* sp. was developed using a N.P.K. fertilizer supplemented with a carbon source in the form of malt extract. The following culture medium was used for biomass production in order to perform biochemical composition analysis, implementation and comparison in *Pleurotus ostreatus* cultures. The culture medium yielded a productivity of 1.78E+6 cells/mL/day and a biomass whose biochemical composition resulted in 20% lipids, 47% proteins, and 19% carbohydrates. The microalgae's biomass used in *Pleurotus ostreatus* cultures, resulted in a maximum mycelium growth rate of 9.66 mm/day when using 0,5 g of microalgae biomass, being significantly lower to a standard medium's 15.97 mm/day. However, the proposed medium demonstrated its effectiveness in mycelium morphology. The group of 0.5 g of microalgae biomass showed a 66.66% probability of matching three characteristics of a standard culture medium, being the texture, density, and growth type. Therefore, the biochemical composition of *Chlorella* sp. cultivated in heterotrophic media serves as an alternative and as a comparable nutrient to standard media for mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* in solid culture."

Keywords: Culture media, *Chlorella* sp, Freshwater, *Pleurotus ostreatus,* Biomass, Biochemical composition.

Introducción

La biomasa de microalgas del género Chlorella tienen una composición bioquímica que varía significativamente dependiendo del medio de cultivo y las condiciones ambientales a las que son sometidas. Cambios que dependen de las características fisiológicas de la cepa a cultivar (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006, como se citó en Silva, Fonseca, 2018)

Entre las características importantes que las cepas de este género de microalgas deben de tener son: la capacidad de poder oxidar una fuente de carbono orgánica; alta productividad; resistente ante otros organismos competidores; resistente a estrés mecánico y químico; resistente a protocolos de cosecha; y adaptación rápida o exitosa a medios de cultivo (Bumbak, Cook, Zachleder, Hauser & Kovar, 2018, como se citó en Silva, Fonseca, 2018).

Medios de cultivo que pueden ser autótrofos o heterótrofos, siendo este último, un medio de cultivo que ha sido propuesto como un método alternativo para la producción a escala industrial. Una de sus mayores ventajas está en la consistencia que tiene la producción de biomasa en comparación a su comportamiento autótrofo, llegando a alcanzar un máximo de 70 g/L en producción de biomasa (Kim, Park, Lee, Seon, Suh, Moon & Chang, 2019).

Este cultivo consiste en la implementación de una fuente de carbono orgánica, como la glucosa, en un medio de cultivo común y someterlo a agitación constante por medio constante remoción en ausencia total de luz. (Fonseca & Silva, 2018)

La producción de biomasa de Chlorella ha establecido un interés comercial por su utilidad como suplemento alimenticio por su contenido de Proteínas, lípidos, carotenoides, carbohidratos, vitaminas y minerales (Silva, 2019). Biomoléculas que son comúnmente cuantificadas por medio de protocolos de espectrofotometría, cuyos puntos críticos residen en

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

el tiempo de proceso, fiabilidad, compatibilidad, precisión y obtención de datos a tiempo real (Thiviyanathan et al, 2024)

A pesar de que existe un creciente interés en estudios sobre posibles aplicaciones para Chlorella alrededor del mundo, la atención está mayormente dirigida a la optimización de medios de cultivo. Por lo que, surge así, la necesidad en la exploración de fuentes de carbono alternativas y sobre todo en la utilidad de la biomasa, la cual es mayormente aprovechada como suplemento alimenticio, piensos o biocombustible. Por lo que, la implementación de este como un nutriente en medios de cultivo sólidos no ha sido propuesto a la fecha de esta investigación, a pesar de coincidir con la necesidad nutritiva de otros microorganismos.

Las características de esta microalga y la utilización de la biomasa poseen una versatilidad significativa y un interés investigativo creciente a nivel global y en el Ecuador, donde podrían ser implementadas en múltiples campos de la industria alimenticia. Un ejemplo de esto, es la industria de la micología, donde es necesario la utilización de ingredientes variados para el crecimiento saludable de cepas de setas gourmet como *Pleurotus ostreatus*. Industria con creciente interés comercial dentro del Ecuador

Pleurotus ostreatus es un hongo lignícola que, para su crecimiento requiere de carbohidratos. Crecimiento que deriva principalmente de la celulosa y hemicelulosa, ya que son capaces de producir enzimas extracelulares (Celulasas y Hemicelulasas) que descomponen la celulosa en polisacáridos más simples que el micelio absorbe para su crecimiento. Además, también tienen la necesidad de nutrirse de proteínas y lípidos para actividades metabólicas o comunicación entre células miceliales (Li, Cui, Wei, Song, Yanhong, Xu, 2022).

Los azúcares son esenciales para el crecimiento de un micelio saludable, especialmente si se implementa un grupo de azúcares complejos, añadiendo minerales, lípidos y proteínas. Composición variada que evitan o aplazan la adaptabilidad o especificidad de la cepa al medio,

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

lo que produce una perdida en la capacidad del hongo de producir enzimas para degradar sustratos más complejos, lo que lleva a la muerte de la cepa o baja producción de biomasa micelial o de setas. (Stamets, 2000)

La salud o vigor de una cepa de *Pleurotus ostreatus* se determina por medio de la velocidad de crecimiento y la morfología, el cual es rápido y con un crecimiento que se denomina como "Algodonoso". Este tipo de crecimiento consiste en un micelio filamentoso en múltiples direcciones y ramificaciones con crecimiento aéreo elevado, dando como resultado una apariencia similar al algodón sobre las placas de cultivo. Llegando a una colonización completa en un intervalo de 5 a 7 días, siendo este, la morfología y velocidad de crecimiento que favorece a la formación de primordios; y es el tipo de crecimiento ideal utilizado en la producción de setas gourmet (Stamets, 2000; Breakwell, Woolverton, MacDonald, Smith & Robinson, 2007).

Es por ello que el propósito de esta investigación es Analizar la biomasa de *Chlorella* sp. dulceacuícola heterótrofa como nutriente en medio de cultivo sólido para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus.*

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Justificación

Chlorella es un género de microalgas que representa uno de los pequeños grupos de microalgas que son capaces de crecer en medios de cultivo que utilizan fuentes alternativas de carbono. Fuentes que se generalmente se presentan en la forma de monosacáridos y polisacáridos, los cuales activan rutas metabólicas de la microalga a optar un comportamiento heterótrofo.

En investigaciones actuales hacen uso de monosacáridos, polisacáridos y ácidos carboxílicos para el desarrollo de los medios de cultivo por fermentación. Por lo que, la implementación de una fuente de carbono alternativa como el Extracto de malta, cuya composición es 90% carbohidratos, podría resultar en un excelente componente nutricional adicional para el cultivo de Chlorella en biorreactores fermentativos.

Biorreactores que inducen una mayor cantidad de biomasa y un incremento en el porcentaje de proteínas o carbohidratos o, en el caso de tener déficit de nitrógeno, produce mayor cantidad de lípidos. Convirtiéndose en una biomasa con un valor nutricional ideal para el crecimiento de otros organismos o microorganismos los cuales generalmente se cultivan en medios sólidos.

Esta producción de biomasa puede ser empleado en el campo de la micología, surgiendo como una nueva respuesta al problema de la preservación o estabilidad de una cepa saprofítica como *Pleurotus ostreatus*, ya que los medios de cultivo disponibles cumplen la función de facilitar la colonización del medio, por lo que no presentan la dificultad necesaria para mantener la vitalidad cepa.

Puesto que, entre los polisacáridos presentes en Chlorella, se encuentra la hemicelulosa, cuya estructura molecular presenta dificultad para ser digerido por *P. ostretus,* lo cual favorece al engrosamiento y crecimiento aéreo micelial; También favorecería como una adaptación

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

temprana para el micelio, previo a su traslado a medios de fructificación o colonización de sustrato celulósico.

El Ecuador presenta un creciente interés en el desarrollo de investigaciones sobre la utilización de biomasa de este género de microalgas. Destacando la utilización de Chlorella como biorremediador; la utilización de compuestos antimicrobianos con fines farmacéuticos; la implementación de esta como biofertilizante para cultivos de *Zea Mays*; y la utilización de pigmentos para confitería. Por lo que hay necesidad de investigaciones adicionales sobre su utilidad para mantener el interés productivo de este género en otros campos de las ciencias biológicas o industriales.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

1. Objetivos

1.1. General

Analizar la biomasa de *Chlorella* sp. dulceacuícola heterótrofa como nutriente en medio de cultivo sólido para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*.

1.2. Específicos

Desarrollar un cultivo de *Chlorella* sp. heterótrofo utilizando el medio de cultivo NPK por fermentación

Determinar la composición bioquímica de la biomasa de *Chlorella* obtenida mediante cuantificación de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Caracterizar el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* utilizando diferentes concentraciones biomasa de *Chlorella*.

2. Hipótesis

2.1. Alternativa

La composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en medios heterótrofos, resulta en un nutriente alternativo y comparable a medios estándar para el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en agar.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

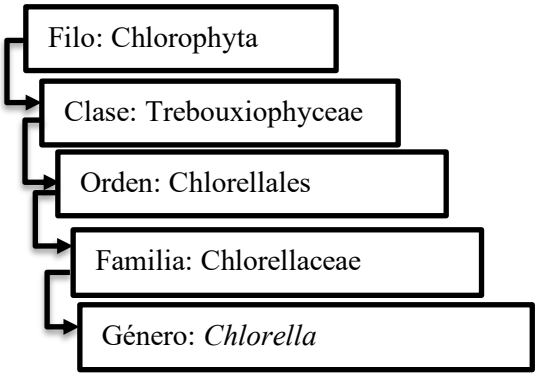
3. Marco teórico

3.1. Chlorella

Este género de microalgas Chlorophytas (**Figura 1 y 2)** existe desde el periodo pre-Cámbrico. Esta es una microalga unicelular que, presentan características cómo: Alta velocidad de crecimiento, adaptabilidad rápida a diferentes ambientes, facilidad de cultivo y bajo costo de producción (Moreno, 2019).

Figura 1.

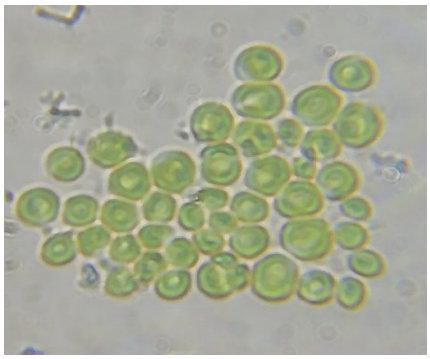
Ubicación taxonómica del género Chlorella



Nota. Obtenido de: Beijerinck, 1890

Figura 2.

*Chlorella sp. observada a 1000x (100x Objetivo * 10x ocular)*



Esta microalga es uno de los géneros de microalgas más estudiados en el mundo (Borowitzka, 2018), donde existen alrededor de 44 especies descubiertas, destacando únicamente 5: *C. vulgaris, C. pyrenoidosa, C. ellipsoidea, C. sorokiniana, y C. kessleri* (Vásquez, 2023).

3.2. Generalidades de Chlorella

Son microalgas de forma esférica con un diámetro aproximado de 2 a 10 μm, rodeada de una pared celular que mantiene la integridad del contenido celular (Safi, Zebib, Merah, Pontalier & Garcia-Vaca, 2014).

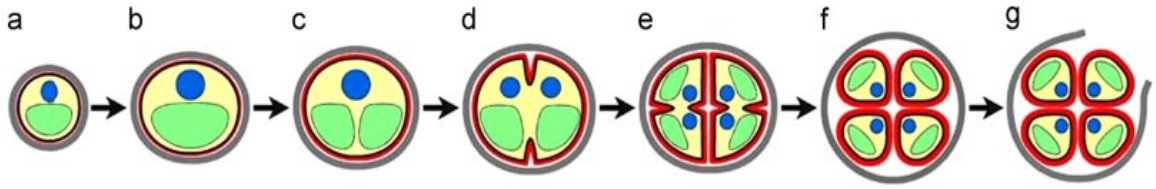
Chlorella vulgaris, es la especie más común dentro del género. Presentan células que carecen de motricidad; una reproducción rápida de forma asexual que se desarrolla de forma

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

autoesporulativa en un lapso de 24 horas, logrando formar 4 células hijas de una célula madre. Las células hijas se forman dentro de la pared celular de la célula madre, una vez formadas, la pared celular de la madre se rompe y las células hijas son liberadas, los restos de la célula madre son consumidos por las células hijas (**Figura 3)** (Safi et al, 2014).

Figura 3.

Fases de la reproducción asexual en Chlorella



Nota. Obtenido de**:** Safi et al, 2014.

3.3. Formas de Nutrición

Autótrofa

Las microalgas se desarrollan por medio de la fotosíntesis, proceso que significa la dependencia de energía solar/lumínica para la biosíntesis de compuestos utilizando elementos traza y macronutrientes como Carbono, Nitrógeno y fosforo (Yun, Kim & Yoo, 2021).

La fotosíntesis usa CO_2 y la energía solar/lumínica para producir energía química en forma de ATP y Glucosa (García et al, 2011).

Mixotrófica o Mixta

Especies del género Chlorella son capaces de combinar comportamientos autótrofos y heterótrofos. Indicando que, son capaces de realizar fotosíntesis e ingerir materia orgánica como glucosa, fructosa o ácido acético de forma simultánea o alternadamente. Por ende, las células no necesariamente son dependientes estrictas de la luz o de componentes orgánicos (Safi et al, 2014; Da Silva & Fonseca, 2018; Yun, Kim & Yoo, 2021).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Heterótrofa

Especies del género de Chlorella tienen la capacidad de optar por un comportamiento heterótrofo en ausencia de luz o CO_2; Utilizando fuentes de carbono como glucosa, acetato, glicerol, glutamato, etc (Safi et al, 2014; Geada et al, 2023; Yun, Kim & Yoo, 2021).

3.4. Cultivos de Chlorella

3.4.1. Fases de crecimiento

Fase de adaptación: Fase de crecimiento que depende significativamente de las condiciones de las células del inóculo, se expresa un retraso en el crecimiento debido a la necesidad fisiológica de las células para adaptarse un medio en condiciones diferentes: Temperatura, pH, iluminación, etc (Arredondo, Voltolina, Savín, Montoya & Gómez, 2017).

Fase de aceleramiento: Representa un incremento en la tasa de crecimiento, donde se produce un incremento en la producción de varios componentes celulares, tales como: ARNm, proteínas, peso individual celular, etc (Arredondo et al, 2017).

Fase exponencial: Fase de corta duración que consiste en el rápido aumento del crecimiento celular debido a la ausencia de factores limitantes (Arredondo et al, 2017).

Fase de desaceleración: Fase que corresponde a la disminución a la tasa de crecimiento y división celular, la concentración celular llega a su punto máximo y la composición bioquímica comienza a cambiar en dirección opuesta a la fase exponencial (Arredondo et al, 2017).

Fase estacionaria: Fase de crecimiento 0, donde la natalidad y mortalidad es igual, fase ocasionada por factores limitantes como la deficiencia de nutrientes, cambios en el pH, baja disponibilidad del medio, deficiencia de oxígeno, elevada concentración celular, deficiencia en la penetración de la luz en el biorreactor o la presencia de metabolitos secundarios o residuos celulares (Arredondo et al, 2017).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Fase de muerte: Tasa de crecimiento negativa, teniendo una tasa de mortalidad superior a la natalidad, produciendo una disminución en la concentración celular (Arredondo et al, 2017).

3.4.2. Condiciones de cultivo generales

Luz. La cantidad de luz recibida por microorganismos fotosintéticos depende de factores como: La densidad celular, distancia óptica (grosor del biorreactor), velocidad de mezclado, densidad de flujo de fotones, etc (Masojídek & Torzillo, 2008).

El rango óptimo de crecimiento para Chlorella está comprendido entre 50 a 150 μmol fotones m^-2 s^-1 con una intensidad de 5000 a 10000 lux con un fotoperiodo de 12 horas, el biorreactor debe de tener una eficiencia en la transmisión de luz del 85,45% al 92,08% (Aly, Elbanna &Fathi, 2024; Sarker & Salam, 2019).

Aireación. La aireación consiste en la circulación de aire en el medio de cultivo, a fin de suministrar el CO2 necesario para procesos fotosintéticos de las microalgas, como también para evitar la acumulación de oxígeno en el biorreactor (Molina et al, 2010; Céspedes, 2016).

pH. Los cultivos de Chlorella*,* específicamente, *Chlorella vulgaris,* presentan un crecimiento optimo en medios de cultivos con un pH de 7 a 7,5 (Jui et al, 2024).

Salinidad (En cepas salinas). Microalgas del género Chlorella*,* específicamente, *Chlorella vulgaris,* son tolerantes a niveles de salinidad de 10 a 40 ppt, teniendo mayor producción de lípidos a 24 ppt y mayor producción de proteínas a 0 ppt (Haris et al, 2022).

Temperatura. En cultivos de microalgas, en fases iniciales, es recomendable utilizar temperaturas de 20 a 26 grados centígrados, dependiendo de la cepa, se podrían utilizar temperaturas más bajas. Cuando se planea dar un mantenimiento prolongado, el rango de

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

temperatura debe de ser de 15 a 21 grados centígrados, sobre todo cuando se piensa alargar el periodo de siembras (Arredondo et al, 2017).

3.4.3. Medios de cultivo

Microalgas del género Chlorella, se han cultivado en varios medios de cultivo cómo: Bold basal, Bg-11, F/2, Fogg's Nitrogen Free, N.P.K., Jhonson, N8-M8, Chu's no. 10, RM, variando en la composición de nutrientes dependiendo de la composición bioquímica a obtener (Wong et al, 2017).

3.4.4. Nitrogen-Phosphorus-Potassium (N.P.K.)

NPK es un fertilizante complejo compuesto principalmente de 3 elementos primarios: Nitrógeno, Fósforo y Potasio. Generalmente utilizado en la agricultura, también tiene sus usos en la producción de microalgas. El nitrógeno aporta en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos; además de ser el elemento principal en la producción de biomasa. El fósforo aporta a la producción de lípidos, rendimiento de ácidos grasos, procesos metabólicos, transferencia de energía, fotosíntesis, producción de fosfolípidos, ADN, ARN y ATP. El potasio es un elemento necesario para funciones regulatorias de las células, activador de enzimas en numerosos procesos fisiológicos y para el mantenimiento de la membrana celular y la homeostasis (Carlson & Capitataine, 2016; Yaakob et al, 2021)

3.4.5. Cultivo heterótrofo

Microalgas como el género Chlorella, cumplen con los requisitos necesarios para cultivos heterótrofos, siendo: División facultativa y metabolismo activo en la ausencia de luz; Habilidad de crecer en medios de cultivos con nutrientes fáciles de esterilizar, donde la oxidación del sustrato orgánico es necesario para procesos energéticos del crecimiento heterótrofo; Adaptación rápida ante cambios en el entorno; capacidad de resistir estrés hidromecánico por agitación en fermentadores (García et al, 2011).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

La respiración oscura durante el comportamiento heterótrofo provee de 2 roles importantes: son una fuente de energía exclusiva para el mantenimiento y biosíntesis durante periodos de oscuridad; y proveen estructuras de carbono de soporte para biosíntesis bajo cualquier condición de cultivo (García et al, 2011).

En estos cultivos, la glucosa es comúnmente usada como fuente de carbono, dado a su capacidad de generar un incremento en la velocidad de crecimiento superior a otras fuentes de carbono como: azucares, azucares alcoholes, fosfatos de azúcar, ácidos orgánicos y alcoholes mono-hídricos (García et al, 2011).

La asimilación oxidativa de la glucosa, comienza con la fosforilación de la hexosa, produciendo Glucosa-6-fosfato, siendo un compuesto necesario para síntesis celular o respiración, estando presente en 2 rutas metabólicas como EMP (Embden-Meyerhof Pathway) y PPP (Pentose Phosphate Pathway) (García et al, 2011).

3.4.6. Composición bioquímica

Chlorella posee una composición estándar de 20% lípidos, 45% proteínas, 20% carbohidratos y 10% minerales y vitaminas. Teniendo variaciones dependiendo de factores nutricionales o ambientales. Esta microalga también posee pigmentos como Clorofila A y B, Beta carotenos, Xantofilas y reservas de carbonos en la forma de almidón (Alves & Fonseca, 2018)

Especies comunes como *Chlorella vulgaris,* en condiciones heterótrofas posee una composición de $41.70 \pm 0.28\%$ proteínas, $34.09 \pm 1.13\%$ de carbohidratos, $21.56 \pm 1.53\%$ de lípidos y $10.37 \pm 0.27\%$ de cenizas o minerales (Geada et al, 2023)

3.5. Cuantificación de macromoléculas por espectrofotometría

3.5.1. Espectrofotómetro

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

El espectrofotómetro es un instrumento de laboratorio utilizado para medir la cantidad de luz absorbida por una muestra, frecuentemente utilizado en determinar la concentración de un soluto en una solución, especialmente macromoléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son capaces de absorber luz en el espectro de luz UV visible (Schmid. 2001).

Generalmente se utilizan 2 fuentes de luz, lámparas de deuterio que emiten luz ultravioleta; o lámparas halógenas de tungsteno, emitiendo una luz monocromática a través de la cuvette y la cantidad de luz que logra travesar la cuvette es medida por un fotomultiplicador o fotodiodo (Schmid. 2001).

3.5.2. Curvas de calibración

Las curvas de calibración son herramientas utilizadas para describir la relación cuantitativa que existe entre una concentración de un analito o sustancia y su señal medida correspondiente en la forma de 'Absorbancia', señal eléctrica o 'Zona de picos'. Son utilizadas para predecir la concentración desconocida de un compuesto de interés en una muestra o analito (Ke & Dezhong, 2024).

Este procedimiento incluye la utilización de soluciones estándar las cuales, dependiendo de su preparación, se pueden dividir en 2 clases: Curvas estándar y Curvas funcionales (Ke & Dezhong, 2024).

Las curvas estándar consisten en la utilización de concentraciones conocidas pero que no son sometidas al protocolo de tratamiento que se le aplica a una muestra desconocida.

Las curvas funcionales son aquellas que someten las concentraciones estándar al mismo procedimiento aplicado a una muestra desconocida.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

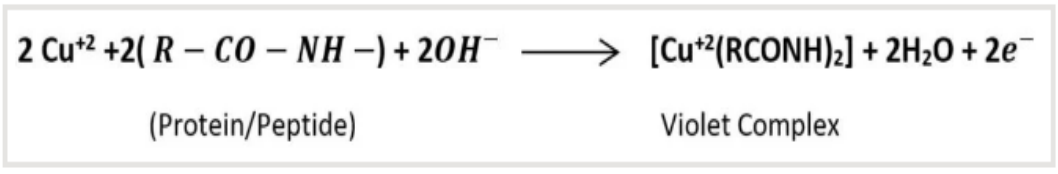
3.5.3. Método de Biuret

El método de Biuret consiste en la implementación de un compuesto con alta basicidad y sulfato cúprico a una muestra de proteínas. Consiste en la unión de iones de cobre del reactivo Biuret a átomos de nitrógeno presentes en los enlaces peptídicos de las proteínas, lo cual dan como resultado la formación de un líquido purpura-violeta. Dependiendo de la intensidad del color, es directamente proporcional a la concentración de enlaces peptídicos en la solución (**Figura 4)** (Aryal, 2023).

El reactivo de Biuret es un compuesto colorimétrico que consiste en la mezcla de Sulfato cúprico, Tartrato mixto de sodio y potasio, Hidróxido de sodio o Hidróxido de potasio disueltos en agua destilada. Se prepara al disolver 1 gramo de cristales de hidróxido de sodio en 100 mL de agua destilada, luego se le añaden 1.2 gramos de tartrato mixto de sodio y potasio; En otro contenedor, se realiza una solución de hidróxido de sodio al 10%; Las 2 soluciones entonces son mezcladas, obteniendo el reactivo de Biuret como resultado (Aryal, 2023; Ruth & Gill, 1963; HiPer, 2014; G-Biosciences, 2022).

Figura 4.

Reacción química del reactivo con una muestra de proteínas. Fuente:



Nota. Obtenido de: Aryal, 2023.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

3.5.4. Método SPV (Sulphu-Phospho-Vanillin)

Método colorimétrico planteado por Van Handle (1985) utilizado para la cuantificación de lípidos en mosquitos, es un método que se ha modificado a lo largo de los años para la determinación de lípidos en suero sanguíneo, alimentos u muestras ecológicas (Inouye & Lotufo, 2006).

El principio de la reacción colorimétrica consiste en la necesidad de tener un enlace doble de carbono-carbono. La muestra de lípidos se mezcla con ácido sulfúrico para formar iones de carbonio; mientras que, el reactivo colorimétrico, el cual es una mezcla entre Vainillina y Ácido fosfórico, forman un estér fosfato, resultando en un incremento en la capacidad de reacción de los grupos carbonilo del reactivo. Al entrar en contacto el reactivo colorimétrico con la muestra hidrolizada, forman un compuesto de color amarillo o rojo, dependiendo de la composición de los reactivos y la cantidad de lípidos en la muestra (Knight, Anderson & Rawle, 1974).

3.5.5. Método Ácido sulfúrico UV-VIS

Método colorimétrico que depende de la deshidratación de carbohidratos en ácido sulfúrico, reacción que lleva a la formación de furfural o Hidroximetilfurfural, un compuesto colorimétrico amarillento, el cual, dependiendo de la intensidad del color, será proporcional a la cantidad de polisacáridos presentes en la muestra (Albalasmeh, Asefaw & Ghezzehei, 2013; López, Gallardo, Echavarría, Sánchez & Restrepo, 2017).

3.6. Micología

3.6.1. Pleurotus ostreatus

Es un hongo basidiomiceto superior que pertenece al diverso grupo de hongos aromáticos comestibles con un alto valor culinario por su elevado valor nutricional por ser rico en proteínas, fibra, vitaminas y minerales. A pesar de tener un elevado valor comerciales e

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

interés productivo, muchas de las empresas a menor escala desaparecen debido a múltiples factores como: Contaminación del producto, dificultad al obtener 'grainspawn' de calidad o la pobre adaptabilidad de una cepa a las condiciones climáticas locales (Mendoza et al, 2014).

3.6.2. Nutrientes esenciales

El crecimiento micelial saludable de hongos depende de fuentes complejas de azucares como: carbohidratos y polisacáridos, siendo ideal la implementación de extractos de malta, papas o madera, componentes que proveen azúcares y una variedad de nutrientes como minerales, vitaminas y sales que aportan al crecimiento, como también la implementación de fuentes de nitrógeno como: peptona, urea o extracto de levaduras (Stamets, 2000; Gonkhom, Luangharn, Hyde, Stadler & Thongklang, 2022).

3.6.3. Medios de cultivo

Para el crecimiento micelial de hongos, existen diferentes medios de cultivo cómo: Agar de zanahoria dextrosa (CDA), Agar de fécula de maíz (CMA), agar de extracto de malta (MEA), Agar de peptona y extracto de levaduras (MYPA), Agar de avena (OMA), Agar de avena y extracto de malta (OMYA), Agar de papa dextrosa (PDA), Agar papa dextrosa y extracto de levadura (PDYA), combinaciones y medios de cultivo necesarios que se intercambian en cultivos subsecuentes para retrasar la senescencia de la cepa (Stamets, 2000; Gonkhom, Luangharn, Hyde, Stadler & Thongklang, 2022).

3.6.4. Senescencia micelial

La senescencia es la pérdida progresiva de crecimiento micelial, culminando en cesamiento total del crecimiento, momento en el que una cepa se considera como muerta. Este comportamiento no se considera lisis ni apoptosis celular debido a que no existe fragmentación

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

de ADN, diseminación de citocromo C o destrucción de la pared celular (Maheshwari & Navaraj, 2008)

Senescencia es la fase del crecimiento micelial de ciertas especies de hongos que ocurre por múltiples factores los cuales no son del todo conocidos, pudiendo ser por cambios ambientales o por cultivos consecutivos, las células senescentes generalmente contienen plásmidos intramitocondriales lineares o circulares que pueden unirse completa o parcialmente al ADN mitocondrial y producir una mutagénesis de inserción, teniendo la capacidad de replicarse más rápido que su contraparte silvestre, diseminándose entre las células hifales interconectadas. La senescencia también se puede manifestar por mutaciones espontaneas letales en genes nucleares. Sin embargo, solo se manifiesta en micelio producto de esporas homocarióticas provenientes de la segregación del núcleo de las células afectadas (Maheswari & Navaraj, 2008)

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

4. Marco metodológico

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio Centro de Investigación Biológica y Pasantías Académicas (CIBPA) en el edificio del Instituto de Investigación Científica y Desarrollo de Tecnologías (INCYT) en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

4.1. Obtención de muestras biológicas

Se utilizó la microalga *Chlorella* sp. registrada con el código PMO22 del laboratorio del Centro de Investigación Biológica y Pasantías Académicas (CIBPA). Cepa obtenida a partir de muestreos realizados en el año 2022 para el proyecto: "BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS AISLADAS DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA COMO UN POTENCIAL RECURSO BIOTECNOLÓGICO" con el Código: CUP: 91870000.0000.384095, con el permiso del Ministerio Ambiente Agua y transición Ecológica MAATE-DBI-CM-2022-0264.

La cepa del hongo *Pleurotus ostreatus* fue obtenida a partir del protocolo de clonación de tejidos en agar de extracto de malta explicado por Stamets (2000). Extraídos a partir de esporocarpios frescos obtenidos a la venta en un supermercado local.

4.1.1. Mantenimiento de la microalga Chlorella sp.

La preparación de los cultivos previos a la experimentación se desarrolló de acuerdo a los protocolos establecidos por Fonseca (2018), Kim et al (2019) y Geada et al (2023) sobre cultivos heterótrofos, modificando parte del protocolo para elaborar cultivos sólidos según Mendoza et al (2014).

El medio de cultivo N.P.K. (30:10:10) marca Nitrofoska® foliar suplementado con extracto de malta se preparó al disolver el fertilizante N.P.K ($1g*L^{-1}$) + Extracto de malta ($10g*L^{-1}$) + Agar agar ($18g* L^{-1}$) en 200 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue

esterilizado a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos, luego, una vez que el medio alcance la temperatura de 45 grados centígrados, 25 mL del medio estéril fue vertido por placa petri y se dejó incubar a 27 grados centígrados durante 24 horas para comprobar esterilidad.

Para inocular las placas, se vertieron 100 µL de un cultivo stock fotoautótrofo de microalgas y se dejó incubar en total oscuridad a 27 grados centígrados.

4.1.2. Mantenimiento del hongo Pleurotus ostreatus

Se preparó agar de extracto malta (LMEA) al disolver Extracto de malta (20 $g*L^{-1}$), carbón activado (5 $g*L^{-1}$), Extracto de levadura (2 $g*L^{-1}$) + Agar l (18$g* L^{-1}$) en 200 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos, luego, una vez que el medio alcance la temperatura de 45 grados centígrados, 25 ml del medio estéril fue vertido por placa Petri y se dejó incubar a 27 grados centígrados durante 24 horas para comprobar esterilidad (Mendoza et al, 2014)

Para inocular las placas, se extrajeron fragmentos de 8mm de diámetro del cultivo aislado, y se colocó en el centro de cada placa con la ayuda de un bisturí o asa de cultivo, luego, Se dejó incubar la placa a 27 grados centígrados en total oscuridad (Mendoza et al. 2014).

4.2. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se obtuvo a partir de conteo celular en una cámara de Neubauer durante un intervalo de 6 días con una frecuencia de 24 horas, utilizando 100 µL del medio cultivo y realizando diluciones en caso de ser necesario. (Guadalupe & Islas, 2017). La concentración celular se determinó utilizando la formula general para calculo y conteo celular por cámara de Neubauer modificado (Guajardo, 2019). Se tomó en cuenta el cambio de pH del medio utilizando bandas colorimétricas marca CitoTest®

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

$$\frac{Células}{ml} = \frac{\#Células}{0{,}4ul} * \frac{1000ul}{1ml} * Factor\ de\ dilución$$

Para determinar la productividad celular, se utilizó la formula planteada por Fonseca (2018).

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

En donde:

μ: Representa la productividad celular de crecimiento

x: Representa la concentración células*mL^{-1}

t: Representa el tiempo en días o tiempo final (antes de la fase exponencial)

Para determinar la tasa de crecimiento, se utilizó la formula planteada por Guillard (1973).

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

En donde:

μ: Tasa de crecimiento

X: Concentración celular en tiempos de fase exponencial

ln: Logaritmo natural X

T: Tiempo en día.

4.3. Masificación de la microalga

Para la masificación de *Chlorella* sp. se utilizó 1 biorreactor de 3000 mL donde se colocaron 2500 L de medio de cultivo. Para el inóculo, se vertió un fragmento de 5 mm del

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

medio de cultivo sólido en el biorreactor. Para lograr el comportamiento heterótrofo, se suministró extracto de malta en una concentración de 10g*L^{-1} dH_2O al medio de cultivo NPK (30:10:10) marca Nitrofoska® foliar con una concentración de 1g*L^{-1} (Fonseca & Silva, 2018). Para evitar un comportamiento mixotrófico, el biorreactor fue sometido a total oscuridad y constante movimiento del medio por medio de un agitado magnético para mantener uniformidad de los nutrientes en todo el nivel del biorreactor (**Figura 5)**.

Figura 5.

Representación gráfica del sistema de masificación

Nota. El sistema de masificación es sometido a oscuridad y agitación magnética constante.

El biorreactor fue suplementado con nutrientes cada 48 horas, utilizando 2 soluciones concentradas de Nitrofoska y Extracto de malta.

El cultivo se repitió 3 veces para alcanzar la cantidad de biomasa necesaria para la preparación del medio de cultivo sólido de *Pleurotus ostreatus* y la cuantificación de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

La cosecha de la microalga se realizó por medio de centrifugación en frascos de polipropileno para centrifugación de 200ml a 4000 RCF durante 5 minutos en cada ciclo en un centrifugador Hermle® 306 (Mera, 2015)

4.4. Composición bioquímica

4.4.1. Preparación de la muestra

Se extrajeron 10 mL de biomasa centrifugada, y se vertieron en una placa Petri para proceder con el proceso de deshidratación durante 24 horas a 37 grados centígrados en una estufa de laboratorio (Aljabri, Cherif, Siddiqui, Bounnit & Saadaoui, 2023). La biomasa seca resultante fue colocada en un mortero y se maceró hasta obtener un fino polvo verde-amarillo. La biomasa entonces fue pesada y separada en alícuotas de 10 mg en tubos eppendorf de 2 mL.

4.4.2. Eliminación de pigmentos

Para realizar los procesos de cuantificación espectrofotométrica de carbohidratos, lípidos y proteínas, es necesario realizar la eliminación de pigmentos a fin de evitar errores de lectura, ya que los métodos a utilizar son colorimétricos.

Para el protocolo, a 10 mg de muestra húmeda de microalgas se le añade 1 mL de acetona al 100% el cual se debe someter a un Vortex por 30 segundos para luego ser centrifugada a 4000 RCF durante 10 minutos y luego se descarta el sobrenadante.

El proceso se repite las veces que sean necesarias para eliminar los pigmentos de la muestra, el cual resulta en una biomasa pálida y translucida o un sobrenadante sin coloración (Hynstova. 2018. Como se citó en: Palmer, Lawton, Kindt, & Edwards, 2021)

4.4.3. Lisado/Disrupción celular

La biomasa de microalga tratada se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, la muestra se suspendió en 1 mL de Buffer para lisis (Hidróxido de sodio 1 mol en Metanol al 25%) el cual

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

fue llevado a un baño maría durante 10 minutos a 70 °C, luego se dejó enfriar en hielo durante 3 minutos. De este, se extrajo 1 mL y se vertieron en un tubo de 2 mL con 1 g de perlas de vidrio de 0.5 mm los cuales fueron llevados a vortex durante 20 minutos. La muestra después fue centrifugada a 4,000 RCF durante 5 minutos, el sobrenadante de la muestra es extraída y utilizada para la cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos (Palmer, Lawton, Kindt, & Edwards, 2021)

4.4.4. Equipos y Formulas

Para la lectura de muestras se utilizaron cuvettes de vidrio (Método de Biuret) y Quarzo (Método SPV y Ácido sulfúrico UV-VIS) para el vertido de muestras, las cuales fueron medidas de acorde a la absorbancia de cada protocolo en un espectrofotómetro UV-VIS modelo Hanon® I5

Para determinar el porcentaje de cada macromolécula, se utilizó la fórmula para porcentaje de proteínas según Arredondo et al (2017), con modificaciones a conveniencia de la presente investigación.

$$\%\ de\ macromolécula = \frac{(Abs/m)}{mb}$$

Donde:

Abs: Indica la absorbancia obtenida por espectrofotometría

m: Representa la pendiente de la curva de calibración

mb: representa la biomasa utilizada en mg

4.4.5. Cuantificación de carbohidratos (Método Ácido sulfúrico UV-VIS)

Se vertió 300 µL de extracto celular en un tubo de ensayo de 10 mL y 1.5 cm de diámetro, luego se vertió 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó en un vortex durante

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

30 segundos para homogenizar la muestra y luego se colocaron en un baño de hielo luego durante 5 minutos. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro con una absorbancia de 315nm (López, Gallardo, Echavarría, Sánchez, Restrepo, 2017; Albalasmeh, Asefaw, & Ghezzhei, 2012).

En este método se utilizó ácido sulfúrico concentrado y reactivo lisis para el blanco; y glucosa en polvo diluida en buffer lisis para la curva de calibración.

4.4.6. Cuantificación de lípidos (Método de Sulfo-Phospho-Vanilin "S-P-V")

Se preparó el reactivo colorimétrico al disolver 200 mg de vanilina en 8mL de etanol puro, la mezcla se realizó en 72 mL de agua destilada, para luego lentamente añadir 20 mL de ácido fosfórico. El reactivo se debe mantener en oscuridad previo a su uso. Para la muestra, se utilizaron 1500 µL de ácido sulfúrico en 300 µL de lisado de microalgas en tubos de ensayo, estos son colocados en un vortex por 10 segundos y luego se las incuba a 90 grados centígrados por 10 minutos. El tubo fue enfriado en hielo durante 5 minutos antes de poder añadir 900 µL del reactivo. Se realizó vortex de forma breve y se lo incuba en oscuridad durante 10 minutos, luego, las muestras son leídas a 530 nm (Palmer et al, 2021; Park, Jeong, Young, Joo, 2016)

En este método se utilizó ácido sulfúrico concentrado y reactivo lisis para el blanco; y Aceite de canola diluido en acetona para la curva de calibración, la acetona debe ser evaporada y reemplazada por 300 µL de buffer lisis.

4.4.7. Cuantificación de proteínas (Método de Biuret)

Se mezcló 1000 µLde lisado de microalgas con 2000 µL del reactivo de Biuret, se dejó reposar la muestra durante 20 minutos para luego realizar la lectura por espectrofotometría a 540 nm (Palmer, Lawton, Kindr, Edwards, 2021; Ruth, 1964; HiPer, 2014; G-Biosciences, 2022).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Para la curva de calibración se utilizó Suero de albumina bovina disuelto en lisis, para el blanco se utilizó buffer lisis y el reactivo de Biuret.

5.5. Implementación de la biomasa microalgal

5.5.1. Preparación de Medio de cultivo sólido

La biomasa húmeda de microalgas fue lavada en agua destilada y centrifugada para eliminar residuos del medio de cultivo, luego fue diluida en agua destilada a una concentración de 0.23 g/mL para facilitar la preparación del medio de cultivo sólido. Se utilizaron placas Petri de plástico de 90mm a las cuales se le añadió aproximadamente 25 mL de medio de cultivo de prueba.

El grupo control se dividió en 2 grupos: Medio de cultivo standard y Medio sin nutrientes. El grupo control servirá para realizar una comparativa del crecimiento entre el agar de prueba con un medio standard (Agar de Extracto de Malta (LMEA) + Carbón activado + Extracto de levadura) y un medio sin nutrientes (Agar-agar y carbón activado). Los cultivos fueron realizados en triplicados.

Para el medio estándar se preparó agar de extracto malta (LMEA) al disolver Extracto de malta (20 $g*L^{-1}$), (5 $g*L^{-1}$) carbón activado, Extracto de levadura (2 $g*L^{-1}$) en 75 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos, luego, una vez que el medio alcance la temperatura de 45 grados centígrados, 25 mL del medio estéril fue vertido por placa Petri y se dejó incubar a 27 grados centígrados durante 24 horas para comprobar esterilidad (Mendoza et al, 2014).

Para el medio sin nutrientes se preparó agar de agua al disolver (5 $g*L^{-1}$) carbón activado y Agar microalga (18 $g*L^{-1}$) en 75 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos, luego, una vez que el medio alcance la temperatura de 45 grados centígrados, 25 mL del medio estéril fue vertido por placa

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Petri y se dejó incubar a 27 grados centígrados durante 24 horas para comprobar esterilidad (Mendoza et al, 2014).

En el grupo tratamiento, se utilizó biomasa húmeda de *Chlorella* sp. en concentraciones de 0,5 g, 1 g y 1,5 g por placa de agar. La biomasa debe de ser húmeda, para facilitar la homogenización y evitar decantación en la placa petri.

Para cada concentración, se utilizó un frasco Erlenmeyer de 250 mL, al que se le añadió la cantidad de biomasa necesaria para los triplicados, la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen de 75 mL y Agar-agar en una proporción de 18 $g*L^{-1}$. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos, se esperó que el medio de cultivo llegue a 45 grados centígrados antes de verter 25 mL por placa, se dejó incubar durante 24h a 27 grados centígrados para comprobar esterilidad (**Figura 6).**

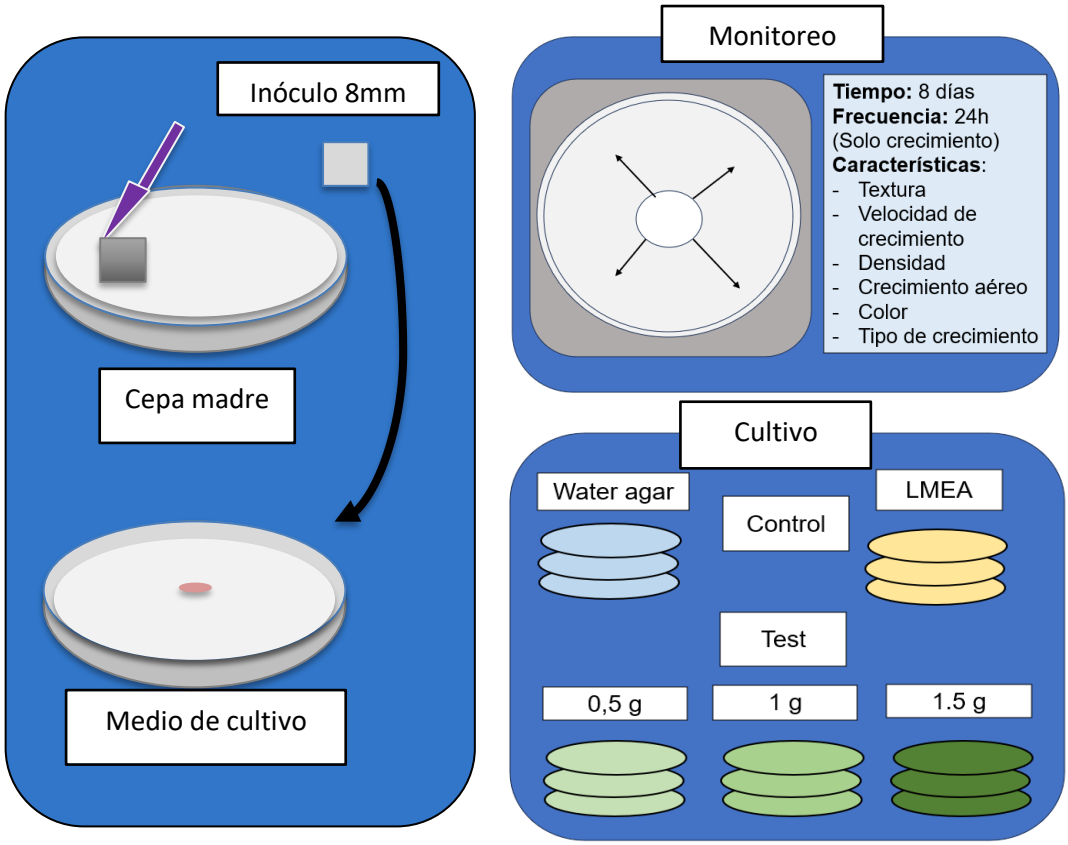
La inoculación de los medios de cultivo se realizó por medio de transferencia de micelio de una placa previamente colonizada en medio Agar extracto de malta (LMEA), cada fragmento fue de aproximadamente 8 mm de diámetro (Mendoza et al, 2014).

La transferencia consiste en el corte de cuadros o triángulos del medio colonizado para luego ser los colocados en el centro de una nueva placa Petri (Stamets, 2000).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Figura 6.

Esquema del proceso de preparación de cultivos y caracterización micelial



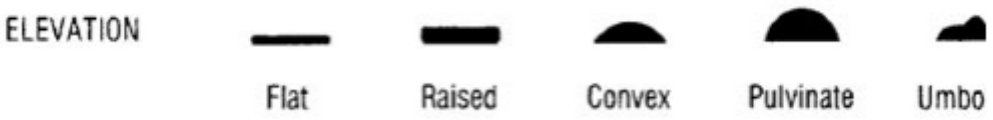
5.5.2. Caracterización del crecimiento micelial

Para la caracterización del crecimiento micelial, se tomó en cuenta el diametro del micelio desde el centro de la placa hasta el extremo más lejano del micelio en milímetros durante un periodo de 7 días y una frecuencia de 24 horas con un calibrador. La morfología del micelio que comprende: el tipo de elevación del micelio (Plano, elevado, convexo, o umbo), textura (algodonoso, flocoso o sin textura), tipo de crecimiento (escaso, abundante o regular), densidad (alto, medio y bajo) y color (sin color, blanquecino y blanco) (**Figura 7 y 8)** se realizaron finalizado el 8vo día de monitoreo (Breakwell, Woolverton, MacDonald, Smith & Robinson, 2007; Mendoza et al, 2014).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Figura 7.

Tipos de elevación de colonias

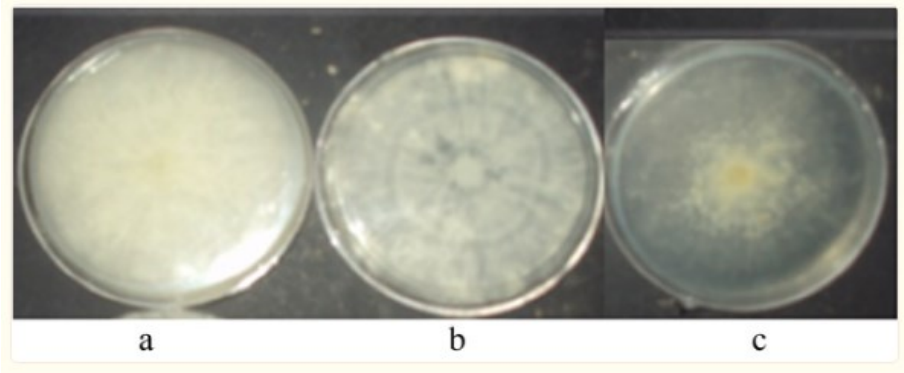


Nota. "Plano, Elevado, Convexo, Pulvinante y Umbo"

Obtenido de**:** Breakwell et al, 2007

Figura 8.

Morfología del micelio de Pleurotus ostreatus



Nota. a) Crecimiento abundante, Densidad alta, textura algodonosa, color blanco; b) Textura algodonosa, densidad regular, crecimiento regular y coloración blanquecina; c) textura flocosa, densidad baja, crecimiento escaso y sin color. Obtenido de: Mendoza et al, 2014

5.5.3. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento

Para el procesamiento de datos se utilizó el Software estadístico Minitab® 20.3, donde se realizó una prueba ANOVA de un solo factor y prueba de Tuckey para determinar si existe una diferencia en la velocidad del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* cultivado en un medio sólido cuya única fuente de nutrientes es la biomasa microalgal contra un medio de cultivo sin nutrientes cómo el agar de agua; y un medio de cultivo estándar como el agar de extracto de malta.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Para determinar la velocidad del crecimiento de cada grupo se utilizará la fórmula de velocidad de crecimiento micelial según Werghemmi et al (2022), donde se tomará en cuenta el diámetro del micelio a partir del día 3 de monitoreo hasta el primer grupo que finalice la colonización.

$$Velocidad\ (\frac{mm}{día}) = \frac{Promedio\ diametro\ final - Promedio\ diametro\ inicial\ (día\ 3)}{tf - ti}$$

Donde:

Promedio del diámetro final: Corresponde al día del primer cultivo que culminó la colonización.

tf: Tiempo final (días).

ti: Tiempo inicial.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

6. Resultados

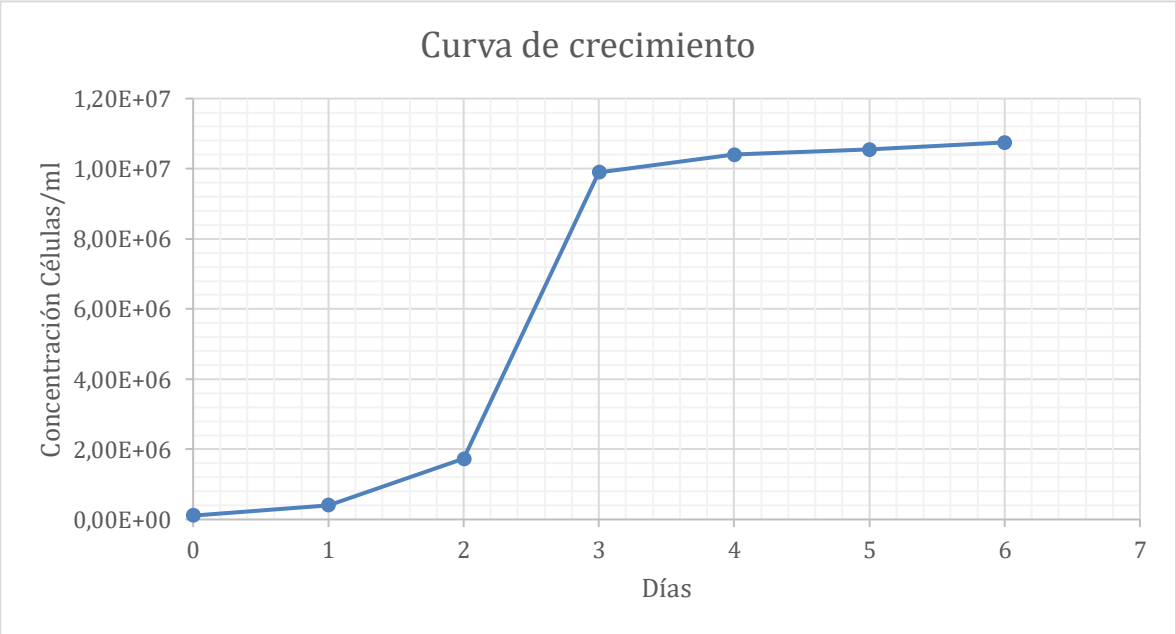
6.5. Cultivo heterótrofo de la microalga *Chlorella* sp.

6.5.1. Rendimiento del medio de cultivo

Se realizó un cultivo de 400 mL con un inóculo inicial de aproximadamente 1.10E+5 células/mL un pH inicial y final de 6. Este cultivo presentó una fase de retraso de 24 horas, desde el día 0 hasta el día 1 por adaptación de la cepa de un medio sólido a suspensión líquida. La fase exponencial se observa desde el día 1 extendiéndose hasta el día 3, caracterizándose por un crecimiento acelerado entre el día 2 y el día 3, pasando de una concentración de 1.73E+6 a una concentración de 9.90E+6 células/mL. A partir del día 3, el cultivo entró rápidamente a la fase estacionaria, donde los incrementos fueron del 1.42% hasta el último día de monitoreo, alcanzando una concentración máxima de 1.08 x 10^7 células/mL (**Figura 9)**.

Figura 9.

Gráfica de la curva de crecimiento.



Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

6.5.2. Productividad celular y Tasa de crecimiento

El cultivo de microalgas en medio N.P.K. suplementado con Maltosa en la forma de extracto de malta, rindieron una productividad celular de 1.78E+6 células/mL/día y una tasa de crecimiento de 1,60 unidades de biomasa por día, a partir de una concentración inicial de 1.10E+05 células/ml en un intervalo de 6 días.

6.6. Composición bioquímica de la biomasa

El cultivo de microalgas en medio N.P.K. suplementado con Maltosa en la forma de extracto de malta, resultaron una biomasa con un porcentaje de proteínas predominantes sobre el % de lípidos y carbohidratos, siendo este último el de menor concentración, siendo esta composición, similar a investigaciones previamente realizadas sobre microalgas del mismo género en condiciones heterótrofas (**Tabla 1).**

Tabla 1.

Composición bioquímica de Chlorella en condiciones heterótrofas

Especie	**Proteínas %**	**Lípidos %**	**Carbohidratos %**
***Chlorella* sp. (Experimental)**	47±6	20.92 ± 0.23	19 ± 1.23
***Chlorella vulgaris* (Geada et al, 2022)**	41,70 ± 0,28	21.56 ± 1.53	34,09 ±1.13
***Chlorella vulgaris* (Geada et al, 2022)**	17,86 ± 0,31	15,08 ± 0,43	50,45 ± 0,13
***Chlorella vulgaris* (Geada et al, 2022)**	16,63 ± 0,17	13,71 ± 1,21	49,59 ± 0,95
***Chlorela vulgaris* (Kim et al, 2019)**	-	30	-

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

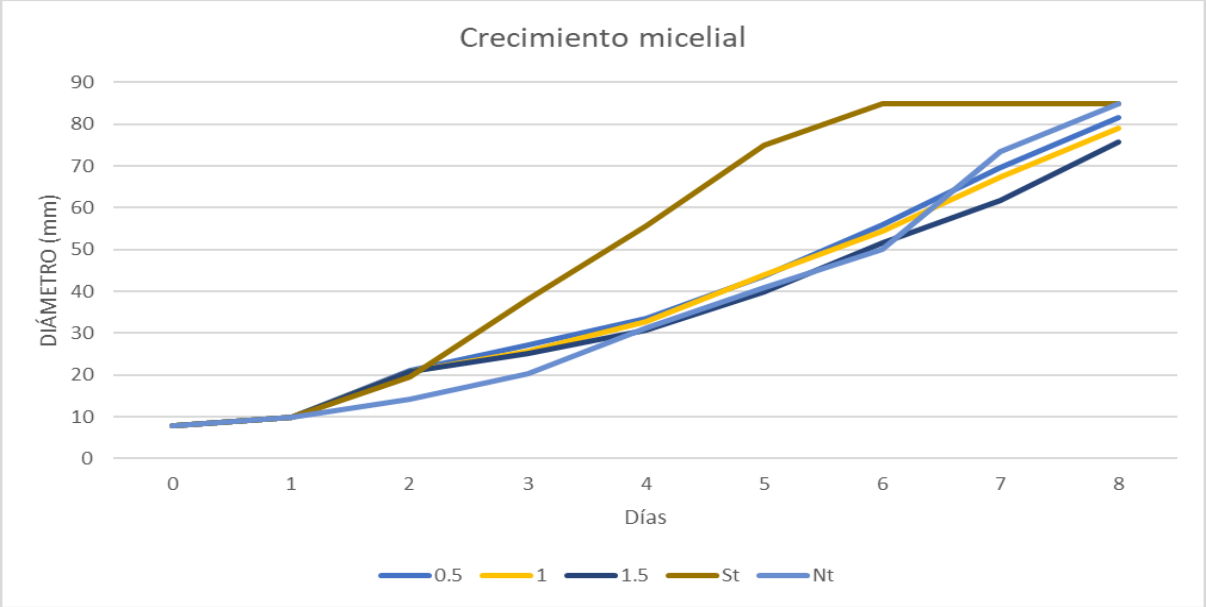
***Chlorella vulgaris* (Barros et al, 2019)**	52.18 ± 1.30	-	-
***Chlorella vulgaris* (Canelli et al, 2020)**	18.9 ± 0	8 ± 0.1 (ácidos grasos)	65,0 ± 0.3

6.7. Caracterización del crecimiento micelial

6.7.1. Crecimiento

Para determinar el efecto del nutriente sobre el crecimiento de cultivo del hongo, se realizaron cultivos por triplicado, los cuales resultaron en un crecimiento con diferencias poco significativas con las concentraciones del grupo tratamiento, terminando la colonización en el día 8. El medio de cultivo estándar (St) presentó diferencia significativa contra el grupo tratamiento al culminar la colonización en el día 6 de monitoreo, mientras que el medio de cultivo sin nutrientes (Nt) presentó similitud ante el grupo tratamiento (**Figura 10).**

Figura 10.
Gráfica del crecimiento del hongo



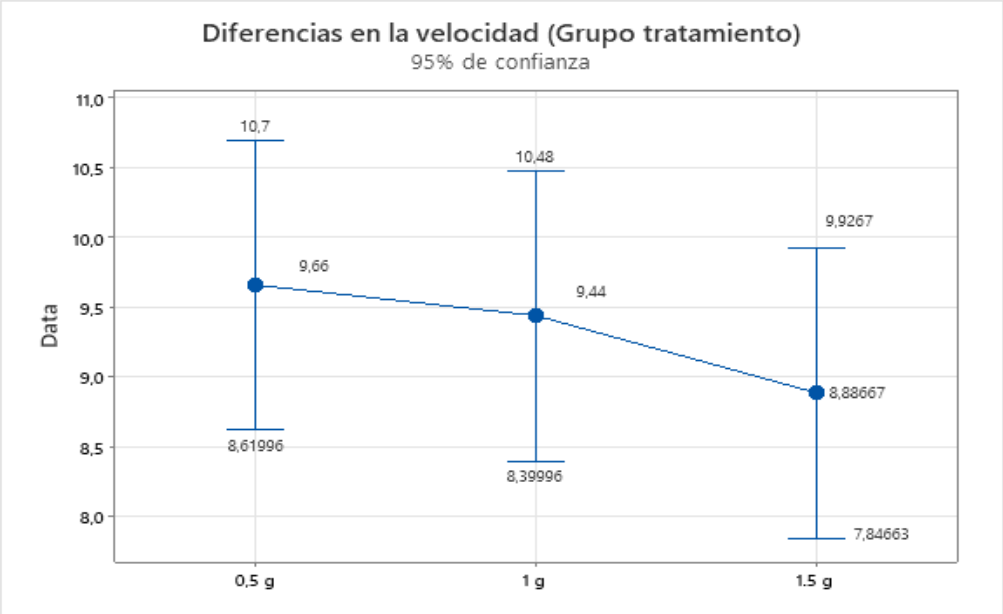
Nota. Grupos: 0.5 g, 1g, 1.5 g, St (estándar), Nt (sin nutrientes).

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

En términos estadísticos, se realizó un análisis ANOVA de un solo factor con un grado de significancia del 95% sobre la velocidad del crecimiento, donde se obtuvo que no existe una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones utilizadas en cada tratamiento, por lo que se obtuvo un valor P = 0.463, siendo mayor al valor α= 0.05 sin embargo, se pudo observar que la concentración de 0.5g de biomasa de microalgas, tuvo el valor de medias superior en comparación a los tratamientos de mayor concentración (**Figura 11).**

Figura 11.

Gráfica de la comparación de medias de la velocidad del grupo tratamiento.



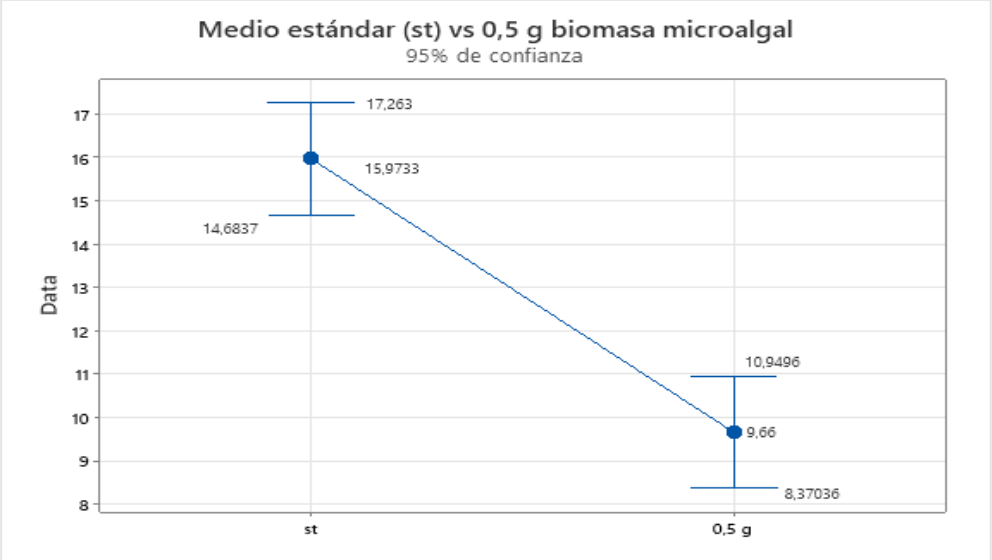
Nota. Concentración de microalgas: 0.5g, 1g y 1.5g

A partir de estas concentraciones, se realiza una comparación entre el grupo tratamiento con el mejor resultado del tratamiento, ante los subgrupos del grupo control. Teniendo como resultado un valor P=0.001, entre el grupo 0,5g de biomasa de microalgas y el medio de cultivo estándar (st), siendo estos estadísticamente diferentes al presentar un valor menor al grado de significancia α=0.05, presentando una diferencia en las medias de 6,31 mm/día (40,48%) (**Figura 12).**

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Figura 12.

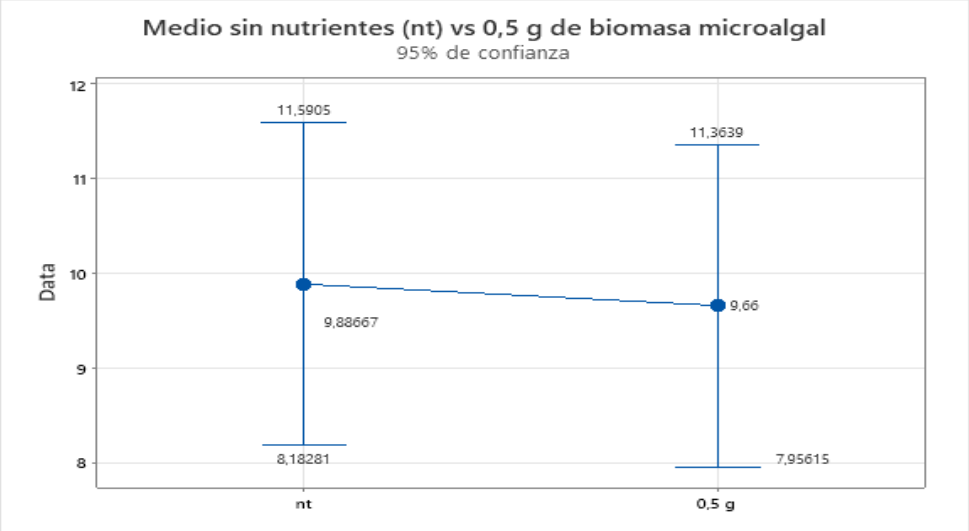
Gráfica del grupo tratamiento 0.5g de biomasa microalgal vs Grupo control Medio estándar (st)



Por otro lado, en el subgrupo de control Medio sin nutrientes, presentó un valor P=0. 807, mayor al grado de significancia α=0.05, por lo que no son estadísticamente diferentes, pero, se puede observar que el medio sin nutrientes presenta una velocidad levemente superior al grupo tratamiento 0,5 g de biomasa de microalgas, presentando una diferencia de 0,22 mm/día (2,25% de diferencia) (**Figura 13).**

Figura 13.

Gráfica del grupo tratamiento 0.5g de biomasa de microalgas vs Grupo control medio sin nutrientes (nt).

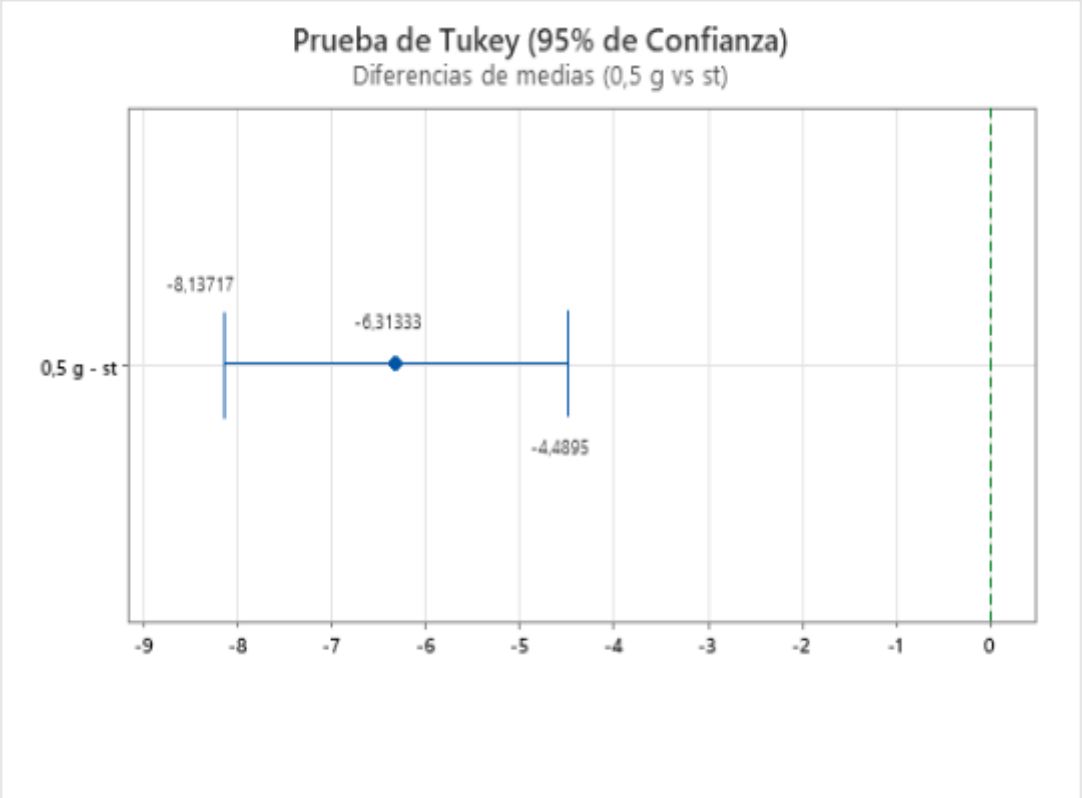


Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Debido a no tener diferencias estadísticamente significativas, se omitió la prueba de Tukey en la comparativa de concentraciones de 0.5 g, 1 g y 1.5 g de biomasa de microalgas; y 0.5 g de biomasa de microalgas y el sub grupo Medio sin nutrientes. Por lo que únicamente se realizó sobre el grupo tratamiento 0,5 g de biomasa de microalgas y el sub grupo Medio estándar, obteniendo que ambos resultados pertenecen a grupos diferentes debido a que el intervalo entre ambas medias no contiene 0 (**Figura 14).**

Figura 14.

Gráfica de diferencia significativa honesta de Tukey sobre el grupo 0,5 g de biomasa de microalgas vs Medio estándar (st)



Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

6.7.2. Morfología del micelio

Grupo control. El grupo sin nutrientes (Agar de agua) desarrolló un micelio sin color, sin textura, crecimiento escaso, baja densidad y sin elevación (plano) en 3 de sus réplicas. Mientras que el medio estándar (Agar de Extracto de malta + Extracto de levadura + carbón activado) presentó la misma morfología en 3 de sus réplicas: un micelio de color blanco, textura algodonosa, crecimiento abundante, densidad alta y con elevación elevada uniforme (**Tabla 2)**.

Tabla 2.

Morfología del crecimiento micelial en el grupo control.

Grupo/Característica	Réplica	Color	Textura	Tipo de crecimiento	Densidad	Elevación
Sin nutriente (Agar de agua)	1	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	2	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	3	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
Estándar (Extracto de malta + extracto de levaduras + carbón activado)	1	Blanco	Algodonosa	Abundante	***	Elevado
	2	Blanco	Algodonosa	Abundante	***	Elevado
	3	Blanco	Algodonosa	Abundante	***	Elevado

Grupo tratamiento. En el grupo de prueba se pudo observar que el 100% de las pruebas presentaron una coloración blanquecina; 44.4% de las réplicas mostraron una textura algodonosa, crecimiento abundante y densidad alta. Estando presente en 2 réplicas del tratamiento 0.5g y 1 réplica en el tratamiento 1g y 1.5g; el 55.55% de las réplicas mostraron una textura flocosa, con crecimiento regular y densidad normal, estando presente en 1 réplica del tratamiento 0.5g y en 2 réplicas del tratamiento con 1g y 1.5g (**Tabla 3).**

A pesar de haber observado una morfología similar o cercano al cultivo estándar en los 3 tratamientos, el tratamiento de 0,5g de biomasa de microalgas presenta una probabilidad

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

mayor de presentar un crecimiento similar al micelio cultivado en un medio estándar, específicamente la textura, tipo de crecimiento y densidad que presentó en 2 de sus 3 réplicas; y presentando una morfología diferente a un medio sin nutrientes en todos los parámetros **(Tabla 4 y Figura 15).**

Tabla 3.

Morfología del crecimiento micelial en el grupo tratamiento

Concentración de biomasa de microalgas	**Réplica**	**Color**	**Textura**	**Tipo de crecimiento**	**Densidad**	**Elevación**
0.5g	1	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	2	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
	3	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
1g	1	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
	2	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	3	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
1.5g	1	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	2	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	3	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

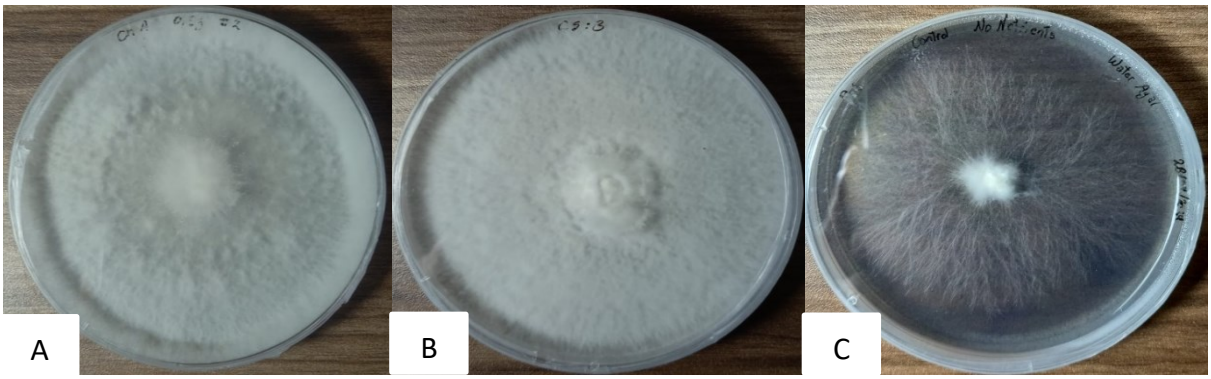
Tabla 4.

Comparación en la morfología del crecimiento micelial: 0.5g Biomasa microalgal vs Medio estándar vs Medio sin nutrientes

Grupo/ Morfología	Réplica	Color	Textura	Tipo de crecimiento	Densidad	Elevación
0.5g de biomasa de microalgas	1	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	2	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
	3	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
Estándar (LMEA)	1	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
	2	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
	3	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
Sin nutriente (Agar de agua)	1	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	2	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	3	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano

Figura 15.

Morfología del micelio de *Pleurotus ostreatus.*



Nota. Ejemplos de medios de cultivo observados: (A) Tratamiento 0.5g biomasa de microalgas -Réplica 3-; (B) Grupo Control Medio estándar -Réplica 3-; (C) Grupo Controlo Medio Sin Nutrientes -Réplica 1-.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

7. Discusión

7.1. Cultivo de la microalga *Chlorella* sp.

El medio de cultivo en el biorreactor tuvo una fase de retraso en su crecimiento debido a la naturaleza del inoculo, el cual se realizó transfiriendo un fragmento de un cultivo sólido a cultivo líquido en un volumen de 400 mL. Sugiriendo que, la microalga requería de adaptación al cambio del entorno según explica García et al (2011). Sin embargo, la duración de la fase fue corta, teniendo una duración de 24h desde el día 0 hasta el día 1, ya que, según Safi et al (2014), Chlorella pertenece a ese grupo de microalgas que son resistentes y de rápida respuesta ante condiciones adversas.

El cultivo culminó en el día 6 de monitoreo, obteniendo una productividad celular de 1,78E06 células/mL/día o 1,78E09 células/L/día siendo superior a la productividad celular obtenida por Fonseca et al (2018) cuyo valor máximo de productividad celular en un medio heterótrofo N.P.K. (20:5:20) + glucosa (10 $g*L^{-1}$) fue de 43E06 células/L/día, teniendo una diferencia del 200% a favor del cultivo de la presente investigación.

Fonseca et al (2017) y Kim et al (2019), demostraron durante sus investigaciones diferencias en la producción de biomasa seca por litro de cultivo y productividad celular, obteniendo los mejores resultados en cultivos suplementados con glucosa. Sin embargo, maltosa en forma de extracto de malta no fue implementada en la comparación. Según García et al (2011), glucosa es la fuente de carbono más utilizada debido a que posee más contenido energético por mol comparado a otras fuentes de carbono como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes mono hídricos, etc. Por lo que, la productividad celular obtenida en la presente investigación no debería ser superior al de cultivos suplementados con glucosa.

Así mismo, durante las investigaciones realizadas por Kong et al (2020), señalan que la productividad de la biomasa obtenida en cultivos suplementados con maltosa fue de 0,162

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

g*L^{-1}*día, siendo inferior a los resultados obtenidos en cultivos suplementados con glucosa 0,191 g*L^{-1}*día. Sin embargo, la productividad de biomasa obtenida por la implementación de maltosa en este estudio, fue la más cercana a la productividad obtenida con glucosa, siendo comparada con fuentes de carbono como: Sacarosa (0,064 g*L^{-1}*día), Xilosa (0,046 g*L^{-1}*día), acetato de sodio (0,104 g*L^{-1}*día) y glicerol (0,088 g*L^{-1}*día). Por lo que, independiente de la medida (g*L^{-1}*día o células*L^{-1}*día) se reafirma que la productividad de la biomasa debería ser similar o inferior a la productividad obtenida en medios suplementados con glucosa.

Entre las posibles causas del elevado valor de productividad celular obtenida, está la concentración del inóculo utilizado. Al ser un inóculo de forma sólida, no permitió la cuantificación apropiada de la concentración celular, lo que sugiere que fue proporcionalmente mayor a la concentración utilizada por Fonseca et al (2018), quienes utilizaron 50 µL de un cultivo stock cómo inóculo, para un volumen de 250 µL de medio de cultivo. Surgiendo también como posibilidad que la diferencia de resultados se debe al volumen de cultivo utilizado para la curva de crecimiento y la metodología empleada para determinar la concentración celular empleada por Fonseca et al (2017). Donde la concentración fue calculada por espectrofotometría en lugar de conteo celular por cámara de Neubauer.

Además de la concentración del inóculo empleado, la causa de una alta concentración celular conduce a razonar dos criterios sobre el efecto, pudiendo ser:

i) El medio de cultivo utilizado, siendo N.P.K. (30:10:10) + Extracto de malta (10 g*L^{-1}). Según Seixas, Hatano & Rossini (2019), el extracto de malta está compuesto de 90% carbohidratos en la forma de maltosa, vitamina B (Niacina en su mayoría), amino ácidos y minerales como magnesio y potasio. Fuente de carbono con un elevado contenido nutricional a diferencia de cultivos realizados por Fonseca et al (2017), Kong et al (2020) y Kim et al

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

(2019), donde emplean fuentes de carbono puras, como glucosa, xilosa, maltosa, etc. Por otro lado, el fertilizante N.P.K. utilizando en la presente investigación posee un porcentaje de nitrógeno (40%) y fósforo (10%) mayor en comparación al fertilizante N.P.K. utilizado por Fonseca et al (2017), siendo Nitrógeno (20%) y Fosforo (5%).

ii) Las características morfológicas, fisiológicas y genéticas de la cepa de cultivo *Chlorella* sp. vs *Chlorella vulgaris* (Fonseca et al. 2017; Kong et al. 2020; Kim et al. 2019), siendo diferentes independiente de la similitud en el género y las condiciones de cultivo.

7.2. Composición bioquímica de la biomasa de microalgas

Indiferente de la productividad celular o biomasa obtenida, es necesario realizar un análisis de la composición bioquímica para determinar el efecto del medio cultivo sobre el crecimiento de la microalga. Efecto que induciría a cambios fisiológicos o activación de rutas metabólicas que cambiarían el balance de producción de macromoléculas como: Proteínas, lípidos o carbohidratos.

Se teorizaba que el medio de cultivo propuesto, induciría la producción de biomasa enriquecida con carbohidratos, similar a la composición bioquímica obtenida por Geada et al (2022), con valores del 30% al 50%. Sin embargo, el medio de cultivo rindió una composición bioquímica de: 47% de proteínas totales, 20% de lípidos y 19% de carbohidratos. Biomasa que mantiene un elevado porcentaje de proteínas y lípidos, siendo similares a los resultados obtenidos por Geada et al (2022), Kim et al (2019) y Canelli et al (2020). A pesar de no ser abundante en carbohidratos, la biomasa obtenida contiene proteínas y lípidos en elevadas concentraciones. Macromoléculas que siguen siendo aprovechados por *Pleurotus ostreatus.*

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

7.3. Implementación de la biomasa de microalgas como nutriente de medio de cultivo

7.3.1. Velocidad de crecimiento micelial

El crecimiento micelial no presentó una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones del grupo tratamiento, pero, existe una diferencia marcada, siendo un descenso en la velocidad de crecimiento, al aumentar la concentración siendo 9,66 mm/día (0.5 g), 9,44 mm/día (1 g) y 8,88 mm/día (1.5 g) respectivamente. El descenso en la velocidad de crecimiento puede ser causado por múltiples factores, posiblemente por inhibidores de crecimiento. Investigaciones científicas demuestran que las microalgas del género Chlorella son reconocidas por producir compuestos antifúngicos como: heptaldeídos, ácido octadecenoico éster metilo, ácido hexadecanoico, etc (Perveen et al, 2022). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos no son estables a temperaturas de esterilización o mayores a 100 grados centígrados (Fredi et al. 2019; SIGMA, 2018; NIST, 2023).

En este sentido, y de acuerdo con Mendoza et al (2014), sobre preparación de cultivos sólidos, en esta investigación, el medio de cultivo conteniendo la biomasa de microalgas se sometió a 121 grados centígrados a 15 psi durante 16 minutos. Sugiriendo que, la esterilización descompuso la mayoría de inhibidores o compuestos antifúngicos.

Es posible que la descomposición de compuestos produjo impurezas o nuevos compuestos que afectan al desarrollo micelial y por ende un descenso en la velocidad de crecimiento. Dicho esto, se entiende que, a menor concentración de microalgas, menor es la posibilidad del efecto.

Al realizar la comparación del tratamiento de 0,5 g de biomasa microalga y un medio de cultivo estándar se puede observar que existe una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento, esto se debe a que el medio de cultivo estándar posee extracto de malta y extracto de levaduras, siendo básicamente: azucares fermentables suplementados con vitaminas,

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

minerales y proteínas. Composición ideal que promueve la rápida colonización del medio de cultivo, por ende, muestran una velocidad de crecimiento elevada (Stamets, 2000).

Obteniendo así una velocidad de crecimiento de 14 a 16 mm/día, siendo estos resultados, similares a los obtenidos por Krupodorova et al (2024), donde registran una velocidad de crecimiento de 12 a 14 mm/día, con la diferencia de que el medio de cultivo presentaba glucosa y peptona en lugar del extracto de malta.

Por otro lado, la comparación entre el medio de cultivo sin nutrientes y el medio de cultivo tratamiento de 0,5 g de biomasa de microalgas, demostraron no tener una diferencia significativa en la velocidad crecimiento, presentando una diferencia del 2.11% a favor del medio sin nutrientes, esto se debe a que, en la ausencia de nutrientes, el micelio de *Pleurotus ostreatus,* se expande rápidamente en busca de nutrientes, siendo este medio de cultivo ideal para clonación de tejidos de muestras silvestres, minimizando la posibilidad de contaminación y forzando a un crecimiento rápido del hongo para su aislamiento (Iqbal, 2017).

7.3.2. Morfología del micelio

Al analizar el rendimiento de un medio de cultivo, la velocidad de crecimiento no brinda los resultados suficientes para determinar su efecto, debido a los medios utilizados en el grupo control.

Según Stamets (2000), el medio de cultivo estándar LMEA está diseñado para una rápida colonización, por lo que, es esperado que exista una diferencia significativa al medio tratamiento.

Por otro lado, según Igbal (2017), el medio de cultivo sin nutrientes induce a un crecimiento rápido en busca de nutrientes resultando en una velocidad levemente mayor al grupo tratamiento.

Razón por la que, al realizar el análisis del crecimiento del hongo, es necesario tener en cuenta la morfología del micelio.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

El grupo de control “Medio estándar” presentó una textura algodonosa, densidad alta, crecimiento abundante; coloración blanca y una elevación “elevada” en las 3 réplicas realizadas. Resultados que coinciden con cultivos de diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus* realizados por Mendoza et al (2014), y siendo características ejemplares de un micelio saludable según los tipos de crecimiento miceliales y morfología de *Pleurotus ostreatus* según Stamets (2000). Por lo que los resultados obtenidos del grupo se pueden establecer como modelo ejemplar de comparación.

El grupo de control “Medio sin nutrientes” presentó una densidad baja; crecimiento escaso; densidad baja; sin coloración; y una elevación “Plana” en las 3 réplicas realizadas, presentándose como un medio de cultivo contrario a las características observadas en el medio de cultivo estándar, por lo que los resultados del grupo se pueden establecer como modelo de comparación.

El 66,66% de las réplicas del grupo tratamiento de 0,5 g de biomasa de microalgas presentaron 3 características iguales a un medio estándar. Características completamente diferentes de un medio sin nutrientes, indicado su efectividad como un nutriente para el crecimiento saludable de *Pleurotus ostreatus.*

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

8. Conclusiones

La utilización del medio de cultivo propuesto demostró un crecimiento celular favorable, obteniendo una productividad celular de 1.08E9 células/L/día. Sin embargo, este resultado es significativamente diferente a investigaciones previas bajo el mismo comportamiento heterótrofo, teniendo múltiples variables sin determinar sin determinar su posible efecto sobre el cultivo. Por lo que, en esta investigación, no es posible establecerlo como un medio de cultivo favorable.

El medio de cultivo propuesto obtuvo una composición bioquímica similar a investigaciones previamente realizadas, obteniendo un contenido de: 47% proteínas y 20% de lípidos, siendo superior al porcentaje de carbohidratos que fue del 19%, resultando en una biomasa baja en polisacáridos necesarios para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus,* pero compensado por el porcentaje de lípidos y proteínas.

El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo sólido experimental presentó los mejores resultados al implementar 0.5 g de biomasa de microalgas, obteniendo una velocidad de crecimiento de 9.66 mm/día, siendo inferior al medio de cultivo estándar 15.97 mm/día, pero, con un 66.66% de probabilidad de coincidir en 3 aspectos morfológicos: textura, densidad y tipo de crecimiento.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

9. Recomendaciones

Debido a los resultados obtenidos, el medio de cultivo propuesto requiere de observaciones y análisis adicionales antes de juzgar su eficiencia sobre el cultivo de *Chlorella.* sp. en condiciones heterótrofas.

Realizar control sobre cambios de pH sobre el medio de cultivo y suministrar aireación al biorreactor fermentativo.

Estandarizar el protocolo de cuantificación de macromoléculas en microalgas del género *Chlorella* o emplear protocolos más precisos y sensibles.

Evaluar el efecto de esterilización sobre la biomasa de microalgas en el medio de cultivo sólido

Desarrollar un método de implementación de biomasa diferente al de esterilización por autoclave a fin de conservar la integridad celular de las microalgas.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Referencias

Ahuatzi, S., Téllez, M., Godinez, G. & Sánchez, C. (16 de junio de 2007). *Mycelial growth of strains of Pleurotus ostreatus developed on agar and its correlation with the productivity in pilot production farm*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/247851925_Mycelial_growth_of_strains_of_Pleurotus_ostreatus_developed_on_agar_and_its_correlation_with_the_productivity_in_pilot_production_farm

Albalasmeh, A., Asefaw, A. & Ghezzehei, T. (24 de abril de 2013). *A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentration using UV spectrophotometry*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/255176344_A_new_method_for_rapid_determination_of_carbohydrate_and_total_carbon_concentrations_using_UV_spectrophotometry

Alfaro, O., Ugás, A. & Yero, R. (10 de enero de 2021). *Modelo dinámico para cultivo mixotrófico (microalgas-bacterias) en un fotobiorreactor de capa fina a gran escala*. SciELO. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852021000200440

Aljabri, H., Cherif, M., Siddiqui, S., Bounnit, T. & Saadaoui, I. (20 de mayo de 2023). *Evidence of the drying technique's impact on the biomass quality of tetraselmis subcordiformis (Chlorophyceae)*. BMC. https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-023-02335-x

Aly, S., ElBanna, N. & Fathi, M. (14 de agosto de 2023). *Chlorella in aquaculture: challenges, opportunities, and disease prevention for sustainable development*. Springer. https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-023-01229-x

Aryal, S. (1 de mayo de 2024). *Spectrophotometer: principle, instrumentation, applications.* MicrobeNotes. Recuperado el 29 de junio de 2023 de https://microbenotes.com/spectrophotometer-principle-instrumentation-applications/

Black, W. (18 de diciembre de 2020). *A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia*. PLOS ONE. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238901

Bligh, E. & Dyer, J. (agosto de 1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. PUBMED. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/

Breakwell, D., Woolverton, C., MacDonald, B., Smith, K. & Robison, R. (1 de septiembre de 2007). *Colony Morphology Protocol. American society for microbiology*. PDF. https://asm.org/Protocols/Colony-Morphology-Protocol

Cai, Y., Liu, Y., Liu, T., Gao, K., Zhang, Q., Cao, L., Wang, Y., Wu, X., Zheng, H., Peng, H. & Ruan, R. (marzo de 2021). *Heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using broken rice hydrolysate as carbon source for biomass and pigment production*. ElSevier. doi:10.1016/j.biortech.2020.124607

Canelli, G. Tarnutzer, C., Carpine, R. Neutsch, L., Bolten, C., Dionisi, F. & Mathys, A. (29 de septiembre de 2020). *Biochemical and nutritional evaluation of Chlorella and auxenochlorella biomasses relevant for food applications*. Frontiers. https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2020.565996/full

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Cheng, YS., Zheng, Y. & VanderGheynst, J. (11 de noviembre de 2011). *Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in microplate format.* doi: 10.1007/s11745-010-3494-0

Dahal, P. (22 de mayo de 2024). *Biuret test for protein: Principle, procedure, results, uses. Microbenotes*. Recuperado el 29 de junio de 2024 de https://microbenotes.com/biuret-test-for-protein/

Dubois, M., Guilles, K., Hamilton, P., Rebers, A. & Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related susbstances*. doi:10.1021/ac60111a017.

El-naggar, N., Hussein, M., Dessuuki, S. & Dalal, S. (20 de febrero de 2020). *Production, extraction and characterization of Chlorella vulgaris soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth*. NATURE. https://www.nature.com/articles/s41598-020-59945-w

Enhnert, S., Seehase, J., Muller, C., Hannig, M. & Ziegler, C. (19 de marzo de 2021). *Simultaneous quantification of total carbohydrate and protein amounts from aqueous solutions by the sulfuric acid ultraviolet absorption method (SA-UV method)*. ELSEVIER. doi:10.1016/j.aca.2021.338712

Fonseca, G. & Silva, A. (7 de marzo de 2018). *Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using microplate assay*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/327156256_Screening_of_an_adapted_culture_medium_composed_by_different_carbon_sources_for_heterotrophic_cultivation_of_Chlorella_vulgaris_using_a_microplate_assay

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

García, O., Escalante, F., Bashan, L. & Bashan, Y. (27 de agosto de 2011). *Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135410006019

Geada, P., Francisco, D., Pereira, F., Maciel, F., Madureira, L., Barros, A., Silva, J., Vicente, A. & Teixeira, J. (marzo de 2023). *Multivariable optimization process of heterotrophic growth of Chlorella vulgaris*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308522001602#bib5

Gong, Y., Zheng, X. & Huang, J. (12 de octubre de 2021). *Chlorella sp. Mg shows special trophic transition and biomass production*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X21002322

Gonkhom, D., Luangharn, T., Hyde, K., Stadler, M. & Thongklang, N. (31 de agosto de 2022). *Optimal conditions for mycelial growth of medicinal mushrooms belonging to the genus Hericium*. SpringerLink. https://link.springer.com/article/10.1007/s11557-022-01829-6

Guajardo, J. (noviembre de 2019). *Fórmula para cálculo de conteo celular en cámara de neubauer*. IDOCPUB. https://idoc.pub/documents/idocpub-2nv85jkkyrlk

Gupta, M., Ho, D., Santoro, D., Torfs, E., Doucet, J., Vanrolleghem, P. & Nakhla, G. (02 de abril de 2018). *Experimental assessment and validation of quantification methods for cellulose content in municipal wastewater sludge*. SpringerLink. https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-1807-7

Handel, E. (1914). *Rapid determination of total lipids in mosquitoes*. CORE. https://core.ac.uk/download/pdf/21596402.pdf

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Haneef, M., Luca, Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I., Guerrero, J. & Athanassiou, A. (enero de 2017). *Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties*. National Library of Medicine. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28117421/

Haris, N., Manan, H., Jusoh, M., Khatoon, H., Katayama, T. & Kasan, N. (febrero de 2022). *Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513421003410

Inouye, L. & Lotufo, G. (28 de febrero de 2006). *Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods*. ScienceDirect. doi: 10.1016/j.talanta.2006.01.024

Iqbal, S., Ashfaq, S., Malik, A., Baq, I., Khan, K. & Mathews, P. (13 de abril de 2017). *Isolation, preservation and revival of Trichoderma viridae in culture media. Entomojournal*. https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartW/5-3-119-171.pdf

Itzhaki, R. & Gill, D. (diciembre de 1964). *A micro-biuret method for estimating proteins*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269764902003

Itzhaki, R. & Gill, M. (1 de octubre de 1964). *A Micro-Biuret Method for estimating proteins*. Analytical biochemestry. doi:10.1016/0003-2697(64)90200-3

Jannat, T., Tasnim, A., Islam, R., Bin, O., Hossain, S., Tasnim, N., Karmakar, D., Hasan, R. & Karim, R. (15 de junio de 2024). *Optimal growth conditions to enhance Chlorella vulgaris biomass production in indoor phyto tank and quality assessment of feed and*

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

culture stock. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024079313

Kim, H., Kimbrel, J., Vaiana, C., Wollard, J., Mayali, X. & Buie, C. (abril de 2022). *Bacterial response to spatial gradients of algal-derived nutrients in a porous microplate*. ISME. https://www.nature.com/articles/s41396-021-01147-x

Kim, H., Park, W., Lee, B., Seon, G., Suh, W., Moon, M. & Chang, Y. (18 de diciembre de 2019). *Optimization of heterotrophic cultivation of chlorella sp. HS2 using screening, statistical assessment, and validation*. SCIENTIFICREPORTS. https://www.nature.com/articles/s41598-019-55854-9

Knight, J., Anderson, S. & Rawle, J. (1 de marzo de 1972). *Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin Reaction for estimating total serum lipids.* Clinical chemistry. https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/18/3/199/5676027?redirectedFrom=fulltext

Kong, W., Yang, S., Wang, H., Hou, H., Guo, B., Liu, N., Zhang, A. & Niu, S. (21 de febrero de 2020). *Regulation of biomass, pigments, and lipid production by Chlorella vulgaris 31 through controlling trophic modes and carbon sources*. Journal of applied phycology. doi:10.1007/s10811-020-02089-1

Krupodorova, T., Barshteyn, V., Tsygankova, V., Sevindik, M. & Blume, Y. (8 de febrero de 2024). *Strain-specific features of Pleurotus ostreatus growth in vitro and some of its biological activities*. PubMed Central. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10851480/

Liu, J. & Chen, F. (2016). *Biology and industrial applications of chlorella: advances and prospects.* NIH. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25537445/

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Lysakowska, P., Sobota, A., & Wirkijowska, A. (14 de julio de 2023). *Medicinal mushrooms: Their bioactive components, nutritional value and application in functional food production – A review*. PubMed Central. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10384337/

López, X., Gallardo, A., Arboleda, C., Sánchez, F. & Restrepo, L. (7 de enero de 2017). *Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales*. Revista cubana de química. PDF. http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v29n2/ind02217.pdf

Maheshwari, R. & Navaraj, A. (1 de marzo de 2008). *Senescence in fungi: a review from neurospora*. Oxford Academic. https://academic.oup.com/femsle/article/280/2/135/545808

Marudhupandi, T., Sathishkumar, R. & Kumar, T. (3 de febrero de 2016). *Heterotrophic cultivation of Nannochloropsis salina for enhancing biomass and lipid production*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X16300030

Masaphy, S. (2013). *Development of media for growth and enumeration of fungi from water*. doi:10.1007/978-1-4614-2356-0_14

Mendoza, P., Del Toro, V., Carrillo, R., Martínez, R., Fernández, Y., Aguilar, G., Hernández, G. & Villa, B. (9 de octubre 2014). *Morphology and mycelial growth rate Pleurotus ostreatus spp. strains from the Mexican Mixtec region*. PubMed Central. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204971/

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Mitra, D., Leeuwen, H. & Lamsal, B. (28 de marzo de 2012). *Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-product*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926412000082

Mtaki, K., Kyewalynga, M. & Mtolera, M. (25 de enero de 2021). *Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (Chlorella vulgaris).* BMC. https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13213-020-01618-0

Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J. & Anandraj, A. (16 de diciembre de 2020). *Biotechnological applications of microalgal oleaginous compounds: current trends of microalgal bioprocessing of products*. FRONTIERS. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2020.598803/full

Neset, L., Takayidza. G., Berven, F. & Hernandez, M. (25 de mayo de 2022). *Comparing efficiency of lysis buffer solutions and sample preparation methods for liquid chromatography-mass spectrometry analysis of human cells and plasma*. PUBMED central. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9181984/

NIST. (2018). *n-Hexadecanoic*. National Institute of Standards and Technology. https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57103&Mask=8#Thermo-React

Nzayisenga, J., Eriksson, K. & Sellstedt, A. (21 de marzo de 2018). *Mixotrophic and heterotrophic production of lipids and carbohydrates by a locally isolated microalga using wastewater as a growth medium*. NIH. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524911/

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Palmer, J., Lawton, L., Kidnt, R. & Edwards, C. (enero de 2021). *Rapid analytical methods for microalgal and cyanobacteral biorefinery: application on strains of industrial importance*. NIH. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33650795/

Park, J., Jeong, H., Yoon, E. & Moon, S. (15 de diciembre de 2016). *Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulphu-phospho-vanillin method*. E-algae. https://www.e-algae.org/journal/view.php?doi=10.4490/algae.2016.31.12.7

Perveen, K., Bukhari, N., Al Masoudi, L., Naser, A., Alruways, M. & Alkhattaf, F. (21 de marzo de 2022). *Antifungal potencial, chemical composition of Chlorella vulgaris and SEM analysis of morphological changes in Fusarium oxysporum*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21010664?via%3Dihub

Safafar, H., Hass, M., Moller, P., Holdf, S. & Jacobsen, C. (29 de julio de 2016). *High-EPA Biomass from Nannochloropsis salina Cultivated in a Flat-Panel Photo-Bioreactor on a Process Water-Enriched Growth Medium*. MarineDrugs. doi:10.3390/md14080144.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. & García, C. (6 de abril de 2014). *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*.ScienceDirect. doi:10.1016/j.rser.2014.04.007

Sarker, N. & Salam, A. (20 de noviembre de 2019). *Indoor and outdoor cultivation of Chlorella vulgaris and its application in wastewater treatment in a tropical city – Bangkok, Thailand*. Springer Link. https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-019-1704-9

Schmid, F. (2001). *Biologícal macromolecules: UV-visible spectrophotometry*. Encyclopedia of life sciences. doi: 10.1038/npg.els.0003142

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Seixas, D., Valim, D. & Rossini, D. (17 de julio de 2019). *Malt extract as a healthy substitute for refined sugar.* Biomedgrid. https://biomedgrid.com/fulltext/volume4/malt-extract-as-a-healthy-substitute-for-refined-sugar.000758.php

SigmaAldrich. (2018). *70145 Malt Extract agar*. Millipore. https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/422/419/70145dat.pdf

Sobal, M., Martínez, D., Morales, P. & Roussos, S. (7 de noviembre de 2007). *Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of México*. Redalyc. PDF. https://www.redalyc.org/pdf/685/68519102.pdf

Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press Berkley.

Verma, R., Kumari, K., Srivastava, A., Kumar, A. (17 de junio de 2020). *Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production*. ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343720304978

Vidotti, A., Riaño-Pachón, D., Mattiello, L., Giraldi, L., Winck, F. & Franco, T. (06 de septiembre de 2020). *Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae Chlorella vulgaris using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches*. ScienceDirect. doi: 10.1016/j.algal.2020.102060

Werghemmi, W., Fayssal, S., Mazouz, H., Hajjaj, H. & Hajji, L. (2022). Olive and gree tea leaves extract in Pleurotus ostreatus var. florida culture media: effect on mycelial linear growth rate, diameter and growth induction index. ResearchGate. https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57103&Mask=8#Thermo-React

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Wong, Y. Ho, H. & Chung, K. (2017). *Growth medium screening for Chlorella vulgaris growth and lipid production.* ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/318531859_Growth_Medium_Screening_for_Chlorella_vulgaris_Growth_and_Lipid_Production

Wychen, V. (2017). *Total carbohydrate content determination of microalgal biomass by Acid hydrolysis followed by espectrophotemetry or liquid chromatography.* Methods in Molecular Biology. doi:10.1007/7651_2017_106

Yaakob, M., Radin, M., Al-Gheethi, A., Ravishan, G. & Rao, R. (14 de febrero de 2021). *Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/349308925_Influence_of_Nitrogen_and_Phosphorus_on_Microalgal_Growth_Biomass_Lipid_and_Fatty_Acid_Production_An_Overview#pf12

Yun, H., Kim, Y. & Yoon, H. (17 de diciembre de 2021). *Effect of Different Cultivation Modes (Photoautotrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic) on the Growth of Chlorella sp. and Biocompositions*. PubMed Central. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8718857/

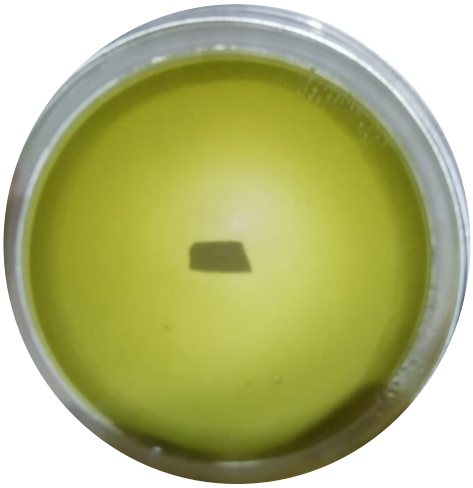
Zubieta, F. (17 de abril de 2022). *Crecimiento in vitro de hongo ostra (Pleurotus ostreatus) en diferentes medios de cultivo*. SciELO. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182022000100010

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

ANEXOS

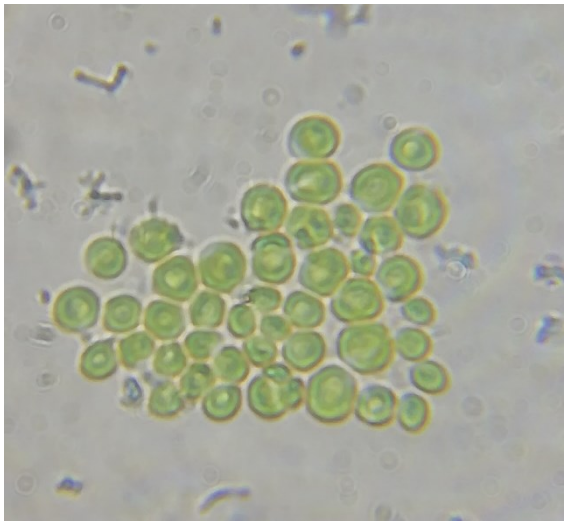
Anexo 1.

Extracción de muestra del medio de cultivo.



Anexo 3.

Prueba preliminar de agar de microalgas.



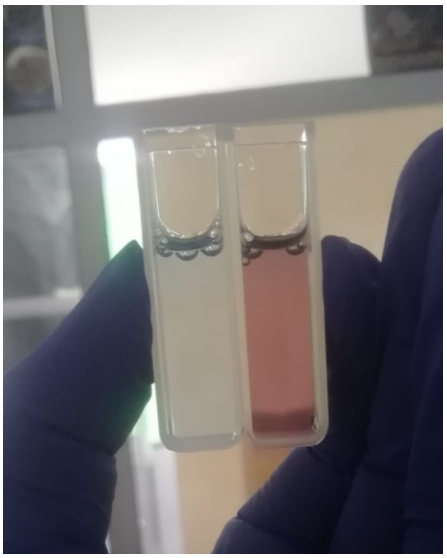
Anexo 2.

Cepa de *Chlorella* sp. en colonias a 1000x.

Anexo 4.

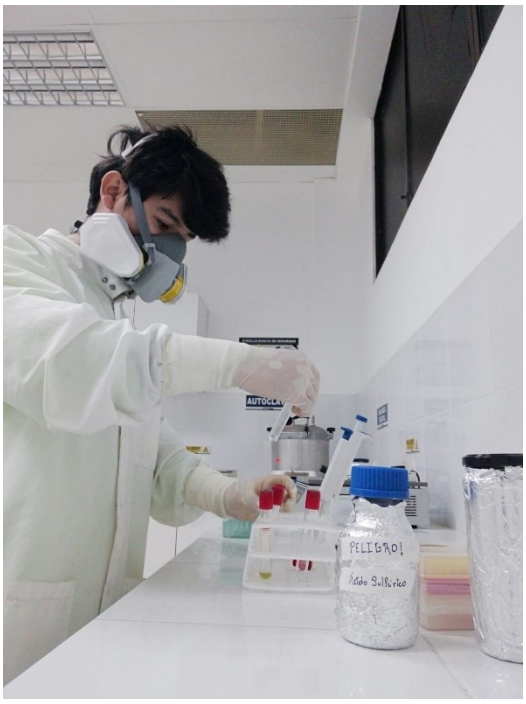
Cepa de *Pleurotus ostreatus en agar LMEA*.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.



Anexo 5.

Colorimetría de proteínas de microalgas por el protocolo de Biuret.



Anexo 6.

Realizando protocolo de carbohidratos totales ‘Ácido sulfúrico UV-VIS’.

Anexo 7.

Muestras colorimétricas del protocolo de lípidos totales ‘Sulphu-Phospho-Vanillin’.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.

Día	Concentración	pH
0	1,10E+05	6
1	4,03E+05	6
2	1,73E+06	6
3	9,90E+06	6
4	1,04E+07	6
5	1,06E+07	6
6	1,08E+07	6

Anexo 8.

Conteo celular y monitoreo del pH en el medio de cultivo.

Monitoreo									
Día/diametro (mm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
No Nutrient	8	10	16	21	35	45	55	80	85
	8	10	15	20	29	36	45	65	85
	8	10	12	20	30	42	50	75	85
Standard	8	10	17	35	55	72	85	85	85
	8	10	21	41	57	76	85	85	85
	8	10	21	38	55	77	85	85	85
0.5	8	10	20	29	35	45	58	70	83
	8	10	20	26	35	43	55	69	82
	8	10	23	26	31	43	55	70	80
1	8	10	20	24	36	45	56	70	83
	8	10	20	27	30	42	52	62	78
	8	10	22	27	32	45	55	70	76
1.5	8	10	20	23	30	40	50	60	73
	8	10	19	22	30	37	50	60	74
	8	10	24	30	32	43	55	65	80

Anexo 9.

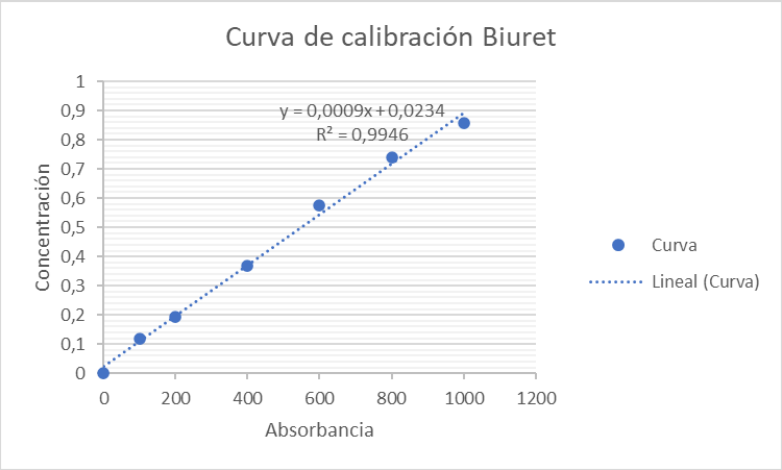
Monitoreo del crecimiento micelial en el intervalo de 8 días de monitoreo.

Morfología						
Grupo/Característica	Replica	Color	Textura	Tipo de crecimiento	Densidad	Elevación
No Nutrient	1	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	2	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
	3	Sin color	Sin textura	Escaso	*	Plano
Standard	1	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
	2	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
	3	Blanco	Algodonoso	Abundante	***	Elevado
0.5	1	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	2	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
	3	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
1	1	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo
	2	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	3	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
1.5	1	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	2	Blanquecino	Flocoso	Regular	**	Umbo
	3	Blanquecino	Algodonoso	Abundante	***	Umbo

Anexo 10.

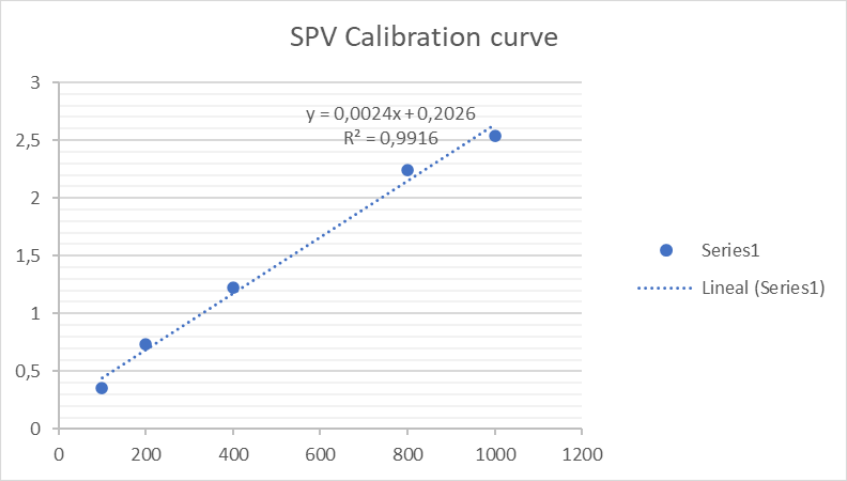
Registro de morfología del grupo control y el grupo tratamiento.

Permiso MAATE: **MAATE-DBI-CM-2022-0264**.



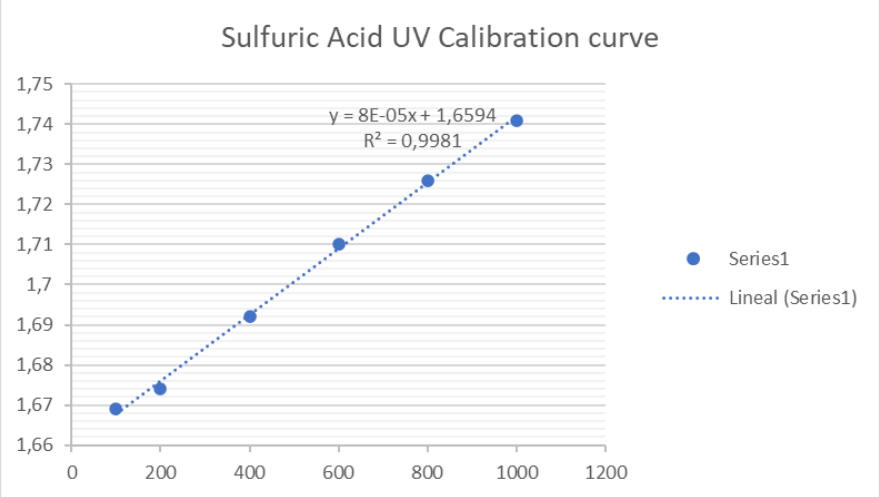
Anexo 11.

Curva de calibración de proteínas totales, protocolo de Biuret.



Anexo 12.

Curva de calibración de proteínas lípidos totales, protocolo de S.P.V.



Anexo 13.

Curva de calibración de carbohidratos totales, protocolo Sulfuric Acid UV-VIS