



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**EFFECTO DE ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO (AIA) EXÓGENO EN LA
PRODUCTIVIDAD DE TRES BIOTIPOS DE *Chlorella* ENDÉMICA
DEL ECUADOR**

AUTOR: AUZ GUERRA, ESTEBAN DAVID

DIRECTOR: ING. ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTÓBAL, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“EFECTO DE ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO (AIA) EXÓGENO EN LA PRODUCTIVIDAD DE TRES BIOTIPOS DE Chlorella ENDÉMICA DEL ECUADOR”*** fue realizado por el señor ***Auz Guerra Esteban David***, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 17 de diciembre de 2019


.....
Dr. Juan Cristóbal Ortiz Tirado, Ph. D.

CC: 170999816-3



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Auz Guerra Esteban David* declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la productividad de tres biotipos de Chlorella endémica del Ecuador”* son de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 17 de diciembre de 2019

Esteban David Auz Guerra

CC: 1714297015



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

*Yo, **Auz Guerra Esteban David** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “Efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la productividad de tres biotipos de *Chlorella* endémica del Ecuador” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 17 de diciembre de 2019

Esteban David Auz Guerra

CC: 1714297015

DEDICATORIA

A mis queridos padres Jaime y Amparito por su apoyo incondicional, por sus consejos, comprensión y sobre todo por su amor, les doy gracias por sus enseñanzas motivo por el cual pude alcanzar mis objetivos, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos José y Made por todos los momentos vividos, por su cariño, su amor incondicional y su apoyo, los quiero mucho.

A mis queridas abuelitas por su amor incondicional

A mis queridos tíos y tías les doy gracias por su cariño, por el ánimo que me han brindado y por su apoyo constante en mi formación académica, los amo mucho

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I, por los conocimientos aportados en mi formación profesional, agradezco a mis maestros por sus enseñanzas y tiempo invertido.

Al Dr. Juan Ortiz, director de tesis por su paciencia, aporte de conocimientos, consejos y guía, en el desarrollo de mi proyecto de tesis y sobre todo por su amistad, a la Ing. Daysi Muñoz por su predisposición y apoyo en la realización de mi proyecto de tesis.

Al apoyo y amor incondicional de mis padres y hermanos, por su respaldo en la realización y culminación de mi proyecto de tesis.

A mi familia por su amor, por su respaldo en mi formación personal y profesional

A mis amigos por las vivencias y momentos amenos compartidos.

ÍNDICE DE CONTENIDO**CARÁTULA**

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii

CAPÍTULO I**INTRODUCCIÓN**

1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Justificación	2
1.3	Objetivos.....	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos	4
1.4	Hipótesis	5

CAPÍTULO II**REVISIÓN DE LITERATURA**

2.1	Microalgas	6
2.2	<i>Chlorella sp.</i>	7

2.2.1	Clasificación taxonómica <i>Chlorella</i> sp.	7
2.2.2	Morfología de <i>Chlorella</i> sp.	8
2.2.3	Reproducción de <i>Chlorella</i> sp.	8
2.2.4	<i>Chlorella</i> sp. Composición química (Porcentaje de peso seco total)	9
2.2.5	Nutrición de microalgas.	9
2.2.6	Reproducción en microalgas.	10
2.2.7	Procesos fisiológicos.	10
2.2.7.1	Fotosíntesis en microalgas	10
2.2.7.1.1	Fase luminosa de la fotosíntesis.	11
2.2.7.1.2	Fase oscura (Ciclo de Calvin) de la fotosíntesis	11
2.2.7.1.3	Foto-respiración	12
2.2.7.1.4	Pigmentos fotosintéticos	13
2.3	Parámetros para el cultivo de microalgas	14
2.3.1	Nutrientes (Medio de cultivo)	14
2.3.1.1	Carbono.	14
2.3.1.2	Nitrógeno	15
2.3.1.3	Fósforo	15
2.3.1.4	Macro y micro nutrientes.	15
2.3.2	Luz	16
2.3.3	Potencial de hidrógeno (pH)	18
2.3.4	Aireación.	19
2.3.5	Salinidad	19
2.3.6	Temperatura	20
2.4	Fases de crecimiento.	20

2.4.1	Fase de adaptación (1)	20
2.4.2	Fase de aceleramiento (2)	20
2.4.3	Fase exponencial (3)	21
2.4.4	Fase de desaceleración (4)	21
2.4.5	Fase estacionaria (5)	21
2.4.6	Fase de muerte (6).....	22
2.5	Manejo del cultivo	22
2.5.1	Control de contaminación.....	22
2.5.2	Cultivo discontinuo.....	23
2.6	Promotores de crecimiento vegetales	24
2.7	Ácido indol 3-acético (AIA).....	24
2.7.1	Efecto de Auxinas en microalgas.....	25
2.7.2	Rutas biosintéticas de las auxinas en microalgas.....	26

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Ubicación del lugar de investigación.....	27
3.1.1	Ubicación Política.....	27
3.1.2	Ubicación Geográfica	27
3.1.3	Condiciones ambientales	27
3.2	Materiales.....	28
3.2.1	Materiales de laboratorio	28
3.2.2	Materiales Biológicos	28
3.2.3	Equipos y programas	28
3.2.4	Reactivos.....	28

3.3	Métodos	28
3.3.1	Purificación de <i>Chlorella</i> andina del Ecuador Biotipos 1, 2,3	29
3.3.2	Masificación de microalgas	30
3.3.3	Preparación del ácido indol 3- acético para las dos fases de laboratorio.....	31
3.3.4	Implementación y seguimiento de la primera fase de laboratorio	31
3.3.4.1	Aplicación de las soluciones de trabajo de AIA.....	31
3.3.4.2	Implementación de la segunda fase de laboratorio.....	32
3.3.5	Variables del estudio.....	32
3.3.5.1	Potencial de hidrógeno (pH):.....	32
3.3.5.2	Concentración celular y densidad óptica	33
3.3.5.2.1	Velocidad específica de crecimiento (Células/hora) (μ)	34
3.3.5.2.2	Tiempo de duplicación (Células horas ⁻¹) (Td).....	35
3.3.5.3	Determinación peso seco total (g L ⁻¹).....	35
3.3.5.4	Cosecha de la biomasa para análisis bromatológicos	36
3.3.5.5	Contenido de Proteína.....	37
3.3.5.6	Lípidos	39
3.3.5.7	Determinación de carotenos, clorofila α y β	40
3.3.6	Diseño Experimental.....	41
3.3.6.1	Factores.....	41
3.3.6.2	Tratamientos	43
3.3.6.3	Tipo de diseño.....	44
3.3.6.4	Características de las unidades experimentales.	44
3.3.6.5	Croquis del diseño experimental.....	45
3.3.6.6	Modelo matemático	45

3.3.7	Análisis estadístico	46
3.3.8	Análisis funcional	46

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados Primera fase de investigación.....	48
4.1.1	Evaluación de Parámetros productivos (Densidad celular y Peso seco)	48
4.1.1.1	Curvas de desarrollo de la (Densidad celular y peso seco).....	49
4.1.2	Evaluación de la cinética de crecimiento (Velocidad específica de crecimiento (μ) (1×10^6 Células día ⁻¹) y tiempo de duplicación (Td) (Hora).....	53
4.1.3	Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	54
4.1.4	Evaluación del contenido de proteínas y lípidos	56
4.1.5	Evaluación del potencial de hidrógeno pH.....	57
4.1.6	Relación entre las variables productivas con las cinéticas de crecimiento, componentes celulares y pH	58
4.2	Resultados Segunda fase de investigación.....	58
4.2.1	Evaluación de Parámetros productivos (Densidad celular y Peso seco)	58
4.2.1.1	Curva de desarrollo (Densidad celular y Peso seco) durante 21 días de evaluación	61
4.2.2	Evaluación de las cinéticas de crecimiento Velocidad específica de crecimiento (μ) (Células día ⁻¹) y tiempo de duplicación (Td) (Hora)	64
4.2.3	Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos (Día 21)	66
4.2.4	Evaluación del contenido de proteínas y lípidos (día 21).....	68
4.2.5	Evaluación del potencial de hidrógeno pH.....	68
4.3	Discusión	70
4.3.1	Evaluación de Parámetros productivos Densidad celular y Peso seco	70

4.3.2	Evaluación de las cinéticas de crecimiento velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td).....	71
4.3.3	Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	72
4.3.4	Evaluación del contenido de proteínas y lípidos	73
4.3.5	Evaluación del potencial de hidrógeno pH.....	75

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones.....	76
5.2	Recomendaciones	77
5.3	Bibliografía.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Combinación de fertilizantes que pueden ser utilizados como medio de cultivo en microalgas</i>	16
Tabla 2	<i>Cálculo relación % v/v primera fase de laboratorio</i>	32
Tabla 3	<i>Ecuaciones lineales para determinar densidad celular células mL⁻¹</i>	34
Tabla 4	<i>Ecuaciones lineales para determinar el peso seco g L⁻¹</i>	36
Tabla 5	<i>Factores y niveles de la investigación fase de laboratorio</i>	42
Tabla 6	<i>Factores y niveles de la investigación fase de campo</i>	42
Tabla 7	<i>Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3 primera fase de laboratorio.</i>	43
Tabla 8	<i>Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3 segunda fase de laboratorio</i>	44
Tabla 9	<i>Promedio ± error estándar de la densidad celular y peso seco obtenidos en el último día de evaluación (día 15).</i>	48
Tabla 10	<i>Promedio ± error estándar de la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td) obtenidos en la fase exponencial (día 7 al 15).</i>	53
Tabla 11	<i>Promedio ± error estándar del contenido de Clorofila α (mg g⁻¹), Clorofila β (mg g⁻¹), Clorofila total (mg g⁻¹), Carotenos (mg g⁻¹) obtenidos en el último día de evaluación (día 15).</i>	55
Tabla 12	<i>Promedio ± error estándar del contenido de proteínas y lípidos obtenidos en el último día de evaluación (día 15).</i>	56
Tabla 13	<i>Coeficiente de correlación de Pearson para las variables productivas</i>	58
Tabla 14	<i>Promedio ± error estándar de la densidad celular y peso seco obtenidos en los días 13 y 21</i>	60
Tabla 15	<i>Promedio ± error estándar de las cinéticas de crecimiento (μ y Td) en los periodos comprendidos entre el (día 7 al 13) y (día 15 al 19).</i>	65

Tabla 16	<i>Promedio \pm error estándar del contenido de Clorofila α (mg g^{-1}), Clorofila β (mg g^{-1}), Clorofila total (mg g^{-1}), Carotenos (mg g^{-1}) obtenidos en el último día de evaluación (día 21).</i>	67
Tabla 17	<i>Promedio \pm error estándar del contenido de proteínas y lípidos obtenidos en el último día de evaluación (día 21).</i>	68
Tabla 18	<i>Promedio \pm error estándar pH obtenidos en los días 13 y 21.</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	A) Célula procariota(<i>Arthrospira platensis</i>), B) Célula eucariota (<i>Chlorella</i> Biotipo 3).....	7
Figura 2	Estructura celular de <i>Chlorella sp.</i>	8
Figura 3	Fases de reproducción de <i>Chlorella sp.</i> (a) fase temprana de crecimiento celular; (b) fase tardía de crecimiento celular; (c) fase de división del cloroplasto; (d) fase temprana de división del protoplasto; (e) fase divisoria tardía del protoplasto; (f) Fase de maduración de células hijas y (g) Fase de incubación.	9
Figura 4	Fase Luminosa y oscura de la fotosíntesis.....	11
Figura 5	Ciclo de Calvin i) Fase de carboxilación, ii) Fase de reducción, iii) Fase de regeneración, iv) Fase de producción.....	12
Figura 6	Estructura de los principales pigmentos fotosintéticos A) Clorofilas B) Carotenoides (β -caroteno)	14
Figura 7	El espectro de radiación electromagnética que muestra, en particular, el espectro de luz visible, Radiación fotosintéticamente activa (PAR) (400 a 700 nm).	18
Figura 8	Tasa de producción de oxígeno específica (P_{O_2} g g ⁻¹ h ⁻¹) en base proteica en función de la densidad de flujo de fotones o quantum ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).....	18
Figura 9	Fases del crecimiento celular en microalgas.....	22
Figura 10	Esquema de producción de un cultivo discontinuo en microalgas	24
Figura 11	Estructura del ácido indol 3-acético (AIA).....	25
Figura 12	Ubicación laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos IASA 1	27
Figura 13	Siembra <i>Chlorella</i> Biotipos 1, 2,3 en medio solido.....	30
Figura 14	Cultivos de <i>Chlorella</i> , A) Cultivo en tubos de ensayo, B) Cultivo en matraces con 100 ml de fertilizante, C) Cultivo en matraces con 250 ml de fertilizante.....	30
Figura 15	Curva de calibración empleando BSA.....	37

Figura 16 Croquis experimental primera fase de laboratorio.....	45
Figura 17 Croquis experimental segunda fase de laboratorio	45
Figura 18 Promedio \pm Desviación estándar, de la Densidad celular (Células mL ⁻¹) durante la primera fase experimental, A) <i>Chlorella</i> Biotipo 1, B) <i>Chlorella</i> Biotipo 2, C) <i>Chlorella</i> Biotipo 3.....	50
Figura 19 Promedio \pm Desviación estándar, del desarrollo del Peso seco (g L ⁻¹) durante la primera fase experimental, A) <i>Chlorella</i> Biotipo 1, B) <i>Chlorella</i> Biotipo 2, C) <i>Chlorella</i> Biotipo 3.....	52
Figura 20 Variación de pH media \pm ee durante la primera etapa experimental.....	57
Figura 21 Promedio \pm Desviación estándar, de la Densidad celular (Células mL ⁻¹) durante la segunda etapa experimental, A) <i>Chlorella</i> Biotipo 1, B) <i>Chlorella</i> Biotipo 2, C) <i>Chlorella</i> Biotipo 3.....	62
Figura 22 Promedio \pm Desviación estándar, del desarrollo del Peso seco (g L ⁻¹) durante la segunda etapa experimental, A) <i>Chlorella</i> Biotipo 1, B) <i>Chlorella</i> Biotipo 2, C) <i>Chlorella</i> Biotipo 3.....	63
Figura 23 Variación de pH media \pm ee, durante la segunda etapa experimental.	69

RESUMEN

La baja productividad de microalgas en sistemas controlados, genera altos costos de producción y poca atención de inversión de productores locales. Por lo tanto, las oportunidades de uso de metabolitos secundarios de algas de interés comercial, se ven desperdiciados. El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la productividad (g L^{-1}) de tres biotipos de *Chlorella* endémica del Ecuador. La investigación se realizó en dos fases, durante el primer experimento se colocaron las soluciones de trabajo de AIA en la etapa de aceleramiento de los cultivos, mientras que en el segundo proyecto se realizó la aplicación de los mejores tratamientos en la etapa de aceleración y fase exponencial. El efecto del AIA exógeno incrementó considerablemente la actividad biológica durante la etapa de aceleración mejorando los parámetros productivos, biomasa (g L^{-1}) y densidad celular (células mL^{-1}). El máximo valor obtenido en los parámetros mencionados se consiguió al incorporar las soluciones de trabajo de 30 mg L^{-1} en *Chlorella* (Biotipos 1 y 3) y 50 mg L^{-1} en *Chlorella* Biotipo 2. Al aplicar las soluciones de 30 y 50 mg L^{-1} de AIA en la etapa exponencial se registró una reducción en la velocidad del desarrollo celular y biomasa. En ambos experimentos se registró un incremento en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Clorofila y carotenos) y en el contenido lipídico, mientras que el componente proteínico no se vio potenciado por el AIA en los tres biotipos de *Chlorella* andina.

PALABRAS CLAVE:

- **MICROALGA *Chlorella***
- **ÁCIDO INDOL 3-ACETICO**
- **BIOMASA**
- **METABOLITOS**

ABSTRACT

The low productivity of microalgae in controlled systems generates high production costs and little investment attention from local producers. Therefore, opportunities for the use of secondary metabolites of algae of commercial interest are wasted. The present project aimed to evaluate the effect of exogenous indol 3-acetic acid (AIA) on the productivity (g L^{-1}) of three biotypes of *Chlorella* endemic to Ecuador. The research was carried out in two phases. During the first experiment the AIA working solutions were placed in the acceleration stage of the crops, while in the second project the best treatments were applied in the acceleration stage and exponential phase. The effect of exogenous AIA considerably increased the biological activity during the acceleration stage improving the productive parameters, biomass (g L^{-1}) and cell density (mL^{-1} cells). The maximum value obtained in the mentioned parameters was achieved by incorporating the working solutions of 30 mg L^{-1} in *Chlorella* (Biotypes 1 and 3) and 50 mg L^{-1} in *Chlorella* Biotype 2. By applying the 30 and 50 mg L^{-1} solutions of AIA in the exponential stage, a reduction in the speed of cell and biomass development was recorded. In both experiments an increase in the content of photosynthetic pigments (Chlorophyll and carotenes) and in the lipid content was recorded, while the protein component was not enhanced by AIA in the three biotypes of *Chlorella* andina.

KEYWORDS:

- **MICROALGAE** *Chlorella*
- **INDOL 3-ACETIC ACID**
- **BIOMASS**
- **METABOLITE**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El uso de las microalgas como alimento para el ser humano se remonta hace más de 2000 años, en China se utilizaba la microalga *Nostoc* en épocas de escases de alimentos. En la década de los 70 se inició la producción a gran escala de varios tipos de microalgas como *Spirulina* y *Chlorella* debido a su alto valor nutricional y contenidos de proteína (Espinoza , 2017).La producción comercial de *Chlorella* sp. como suplemento alimenticio se inició en Japón en la década de 1960, en la actualidad se distribuye como un suplemento alimenticio en varios países como EEUU, China, Japón y Europa con una producción estimada de 2000 toneladas/año (Batista, Gouveia, Bandarra, Franco, & Raymundo, 2013).

En la actualidad el uso de microalgas se ha diversificado introduciéndose en áreas como la acuicultura, agricultura, industria, farmacéutica, cosmetología, alimentación (humana y pecuaria), purificación de aguas residuales entre otras. Se han realizado varios estudios para elaborar combustibles como biodiesel y bio-metano a partir de microalgas clorofíceas, oleaginosas y dinofíceas debido a la alta producción de lípidos (Medina, Piña, Nieves, Arzola, & Guerrero, 2012). La microalga *Chlorella* sp. tiene la capacidad de producir ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) como el ácido palmítico, linoléico, linolénico, oléico y esteárico (Tejeda, Henao, Alvear, & Castillo, 2015). Además, poseen un alto contenido de proteínas proporcionando a este un alto valor nutricional alto (Espinoza , 2017).

En *Oreochromis niloticus* se ha determinado que la inclusión del 10 % de *Chlorella vulgaris* en dietas balanceadas actúa como agente anti microbiano en contra de patógenos como *Aeromonas*

sobria (Galal, Reda, & Abdel-Rahman Mohamed, 2018). El uso de extractos orgánicos de *Chlorella pyrenoidosa* ha demostrado tener propiedades anti fúngicas contra *Fusarium monofiliiform* causante de la enfermedad de las branquias negras en camarón (Charlotte, François, & Travers, 2016). La acuicultura es un área que ha tenido un auge considerable en el campo de la producción alimenticia debido a la introducción de nuevas especies. Las microalgas juegan un papel importante en la alimentación de varias especies de interés acuícola, siendo suministradas como aditivos en el cultivo comercial de especies acuáticas como crustáceos o peces, además en los sistemas de cultivo de especies acuáticas influyen en el contenido de O₂ y CO₂ del medio, interviniendo directamente en el desarrollo de la fauna acuática (Cerón, 2013).

Se ha identificado que la aplicación de auxinas en *Chlorella pyrenoidosa* estimula el contenido de proteínas solubles, el contenido de clorofila y favorece la división celular incrementando el contenido de biomasa (Antoun, Bashan, & de-Bashan, 2008) .

1.2 Justificación

Los promotores de crecimiento vegetales, naturales o artificiales actúan como mensajeros químicos que intervienen en el desarrollo de varios procesos fisiológicos en plantas como el crecimiento y florecimiento (Udayan & Arumugam, 2017). Las auxinas son hormonas vegetales que inducen el crecimiento de raíces en respuesta a la luz y gravedad, producen división celular y formación de raíces adventicias en plantas estimulando la división y elongación celular (Antoun, Bashan, & de-Bashan, 2008).

El uso de Auxinas se puede extender al campo de producción de microalgas mejorando la viabilidad comercial de las aplicaciones de la biomasa, lo cual puede ser una vía eficiente para reducir los costos de producción por tonelada de biomasa, favoreciendo la rentabilidad de

empresas dedicadas a la producción de elementos derivados de las microalgas (Liu, Qiu, & Song, 2016).

En el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* se ha determinado que el uso de auxinas como de ácido indol 3-acético promueve la elongación y división celular, además de favorecer la acumulación de ácidos grasos (palmítico y esteárico) favorables para la elaboración de biocombustibles (Jusoh, Hong, Seng, Aziz, & San, 2015). Se ha comprobado que el ácido indol 3-acético en *Chlorella vulgaris* estimula la división celular, el contenido de clorofila y lípidos (Liu, Qiu, & Song, 2016).

En la actualidad las microalgas son consideradas como materias primas prometedoras en la acuicultura, *Chlorella minutissima* es un alga verde rica en aceites benéficos como los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (n-3 LC-PUFA) los cuales podrían ser incorporados como complemento alimenticio en los primeros estadios de peces (Halima, 2017).

El desconocimiento de técnicas de estimulación celular en la producción de microalgas como el uso de promotores vegetales de crecimiento se ve reflejado en una baja productividad de biomasa de estos organismos de interés comercial, lo cuál incrementa el costo de producción de la biomasa y en especial de los bioproductos útiles para diferentes aplicaciones industriales.

La baja productividad de biomasa obtenida mediante técnicas convencionales de producción no permite explotar el potencial de las microalgas a nivel industrial en diferentes áreas como la agricultura, energía, alimentación entre otras. Las técnicas convencionales de producción no permiten incrementar la obtención de bioproductos de interés comercial.

El desconocimiento de técnicas de estimulación celular con promotores de crecimiento vegetal incurre en una baja productividad de biomasa algal (g L^{-1}), lo cual incrementa los costos de

producción de la biomasa. Las técnicas convencionales de producción limitan el contenido de proteínas y pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) de uso comercial.

El presente estudio tiene como fin evaluar el efecto del ácido indol -3 acético (AIA) exógeno en la productividad de 3 biotipos de *Chlorella* sp. con el objetivo de mejorar la productividad de estos organismos de interés comercial.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la productividad de biomasa (g L^{-1}) de tres biotipos de *Chlorella* endémica del Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la dosis respuesta al ácido indol-3 acético (AIA) en la producción y productividad de biomasa (g L^{-1}) de tres biotipos de *Chlorella*., bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar la productividad de biomasa algal y sus componentes celulares en los tres biotipos de *Chlorella*, empleando los mejores tratamientos con ácido indol-3 acético (AIA) definidos en la primera fase de laboratorio.
- Elaborar un manual técnico para la transferencia tecnológica del cultivo de *Chlorella* sp. desarrollado en el laboratorio de Recursos Acuáticos de la ESPE.

1.4 Hipótesis

H₀: La aplicación de ácido indol 3-acético exógeno (AIA) en concentraciones de 10 a 50 mg L⁻¹, no incrementa la productividad, no genera cambios en los componentes bromatológicos de tres biotipos de *Chlorella* andina del Ecuador.

H₁: La aplicación de ácido indol 3-acético exógeno (AIA) en concentraciones de 10 a 50 mg L⁻¹, incrementa la productividad y genera cambios en las concentraciones de los componentes bromatológicos de tres biotipos de *Chlorella* andina del Ecuador.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Microalgas

Las microalgas comprenden la base de la cadena alimenticia en los ecosistemas marinos, existen más de 30 mil especies de las cuales apenas 10 son de uso comercial. Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos con tamaños que oscilan de 2 a 200 μm , son altamente eficientes en la utilización de la energía solar y en la fijación del CO_2 para producir biomasa (González, 2015).

Existen dos grandes grupos de microalgas, eucariotas y procariotas. Las células procariotas (Cianofíceas y Proclorófitas) no poseen orgánulos con membrana, su ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra en una molécula circular localizada en el citoplasma. Por otra parte, las eucariotas (Clorofíceas, Crisofíceas, Haptofíceas, Bacilarofíceas, Pirofíceas, Criptofíceas y Euglenofíceas) poseen una pared constituida de polisacáridos y organelos con membrana celular, como los cloroplastos y núcleo en donde se encuentra el material genético (Guaman Burneo & González Romero, 2016).

La pared celular en microalgas es una matriz amorfa que delimita los orgánulos internos de la microalga está compuesta de una estructura fibrilar cuyos principales componentes son celulosa, hemicelulosa, quitina, además está constituida por macromoléculas como proteínas, pectina y peptidoglicano (Guaman Burneo & González Romero, 2016).

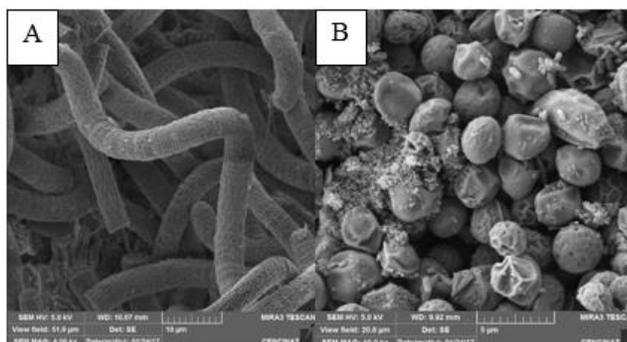


Figura 1. A) Célula procariota (*Arthrospira platensis*), B) Célula eucariota (*Chlorella* Biotipo 3)

Fuente: Ing. Juan Ortiz Tirado, Phd.

2.2 *Chlorella* sp.

Chlorella sp. Es un alga verde unicelular de agua dulce, las células tienen forma esférica, puede encontrarse agrupadas en colonias de varias células. Se caracteriza por presentar cantidades altas de clorofila, beta-carotenos, vitaminas (C, E), minerales (hierro, calcio), contenidos de proteína hasta un 70 % y 10 aminoácidos esenciales y 9 complementarios. Se reproducen mediante la ruptura de la pared celular y la posterior liberación de auto esporas producidas en la célula madre (Guaman Burneo & Gonzáles Romero, 2016).

2.2.1 Clasificación taxonómica *Chlorella* sp.

Reino: *Plantae*
 Phylum: *Chlorophyta*
 Clase: *Trebouxiophyceae*
 Orden: *Chlorellales*
 Familia: *Chlorellaceae*
 Género: *Chlorella*

Fuente: (Guiry & Guiry, 2020)

2.2.2 Morfología de *Chlorella* sp.

Chlorella sp. posee células con una forma esférica cuyo diámetro oscila entre 2 a 10 μm de diámetro, presenta una pared celular que limita los contenidos internos de la célula, y está compuesta por hemicelulosa (Fracción soluble) y glucosamina polisacárido similar a la quitina (Fracción rígida) (Hubert, Ricochon, Linder, & Muniglia, 2017).

El citoplasma se encuentra en el interior de la pared celular, está compuesto por proteínas solubles, agua y minerales, alberga vacuolas, un núcleo pequeño un solo cloroplasto y el aparato de Golgi. Cada mitocondria contiene parte del material genético, el aparato respiratorio está constituido por una doble capa de membrana. El cloroplasto posee forma de copa, con doble envoltura de membrana compuesta por fosfolípidos, los pirenoides en el cloroplasto poseen niveles altos de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO). El cloroplasto posee un grupo de tilacoides fusionados, donde se sintetiza la clorofila (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

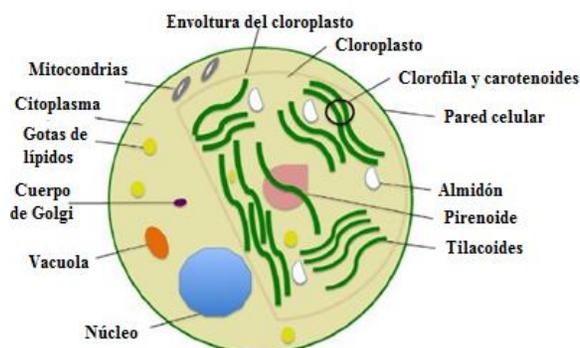


Figura 2. Estructura celular de *Chlorella* sp.
Fuente: (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

2.2.3 Reproducción de *Chlorella* sp.

Se reproduce de forma asexual por autoesporas, en la fase de maduración se forman 4 células hijas con pared celular dentro de la célula madre. Después de la maduración de las células recién

formadas la célula madre rompe la pared celular permitiendo la liberación de las células hijas y los restos de la célula madre sirven de alimento para las nuevas células (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

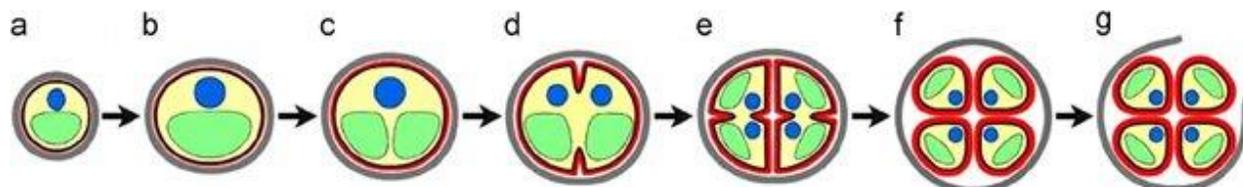


Figura 3. Fases de reproducción de *Chlorella* sp. (a) fase temprana de crecimiento celular; (b) fase tardía de crecimiento celular; (c) fase de división del cloroplasto; (d) fase temprana de división del protoplasto; (e) fase divisoria tardía del protoplasto; (f) Fase de maduración de células hijas y (g) Fase de incubación.

Fuente: (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

2.2.4 *Chlorella* sp. Composición química (Porcentaje de peso seco total)

La microalga *Chlorella* sp. posee entre el 51-58 % de proteína, 12-17% de carbohidratos y 16-40 % de lípidos. El 10 % del peso seco total restante está compuesto por minerales, pigmentos, ácidos nucleicos y otros componentes menores. Debido al alto contenido de lípidos que posee *Chlorella* sp. está siendo utilizada para la producción de biodiesel y por su alto contenido proteínico se la está empleando en el ámbito nutricional (Humano y pecuario) (Ramírez, Rendón, & Vélez, 2013).

2.2.5 Nutrición de microalgas

Según las estrategias metabólicas las microalgas se pueden clasificar de la siguiente manera:

- **Fotoautótrofas:** Implica el uso de la luz solar como fuente de energía y el CO₂ como recurso de carbono para la producción de adenosin trifosfato (ATP) y carbohidratos (Guaman Burneo & González Romero, 2016).

- **Fotoheterótrofos:** Obtienen energía a partir de la luz solar y utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono (Ejemplo: *Gymnodium gracilentum*, Dinophyta) (Gonzáles, 2015).

- **Mixotróficas:** Se desarrollan mediante procesos autótrofos y heterótrofos, obtienen energía a partir de la luz solar y materia orgánica, el CO₂ y compuestos orgánicos son la fuente principal de carbono (Ejemplo: *Spirulina platensis*) (Gonzáles, 2015).

- **Heterótrofa:** Pueden desarrollarse en ausencia de Luz, compuestos orgánicos son empleados como fuente de energía y carbono (Ejemplo: *Chlorella protothecoides*) (Gonzáles, 2015).

Para el cultivo industrial habla sobre las características de los medios de cultivo, F2, BG 11, nitrofoscka, zorrouk, etc

2.2.6 Reproducción en microalgas

La reproducción en microalgas generalmente es asexual por mitosis proceso que implica división celular consecutiva, lo cual produce un incremento en la biomasa total, sin embargo, también se pueden reproducir sexualmente mediante procesos de oogamia e isogamia en donde se efectúa una recombinación de genes produciendo variabilidad genética en la población (Dreckmann, Senties, & Núñez, 2013).

2.2.7 Procesos fisiológicos

2.2.7.1 Fotosíntesis en microalgas

Es un proceso mediante el cual plantas y microalgas sintetizan materia orgánica a partir de la energía lumínica y materia inorgánica. La importancia de este proceso radica en la introducción de nutrientes en las cadenas tróficas de los ecosistemas, en donde se genera materia orgánica que es consumida por otros organismos (Ruiz, 2011). La estequiometría del proceso fotosintético está desarrollada de la siguiente manera:



El proceso de fotosíntesis se divide en dos fases: Luminosa y oscura

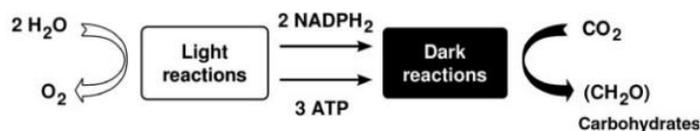


Figura 4. Fase Luminosa y oscura de la fotosíntesis.

Fuente: (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.7.1.1 Fase luminosa de la fotosíntesis

Los fotones de luz son captados por moléculas de clorofila y otros pigmentos (Carotenoides) localizados en los cloroplastos y son transportados a los fotosistemas I y II. El paso de los electrones por los fotosistemas I y II produce Adenosin trifosfato (ATP) y Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) indispensables para asimilación del CO_2 . Los electrones situados en el fotosistema II disocian la molécula de agua y el resultado de esta reacción es oxígeno molecular (Lissarrague, Baeza, & Sánchez, 2010).

2.2.7.1.2 Fase oscura (Ciclo de Calvin) de la fotosíntesis

En esta fase la energía captada es utilizada para reducir el CO_2 en carbohidratos para lo cual se emplean 8 fotones por cada molécula de CO_2 , y se utiliza ATP y NADPH producidos en la fase luminosa. En esta etapa el ciclo de Calvin actúa en conjunto con las reacciones de la fase luminosa en donde se transforma el CO_2 en glucosa u otros compuestos.

El ciclo de Calvin se produce en 4 fases: Fase de carboxilación, Fase de reducción, Fase de regeneración y Fase de producción.

En la fase de carboxilación se agrega al CO_2 la azúcar, bifosfato de ribulosa (Ribulosa-bis-P), para formar dos moléculas de fosfoglicerato (glicerato-P). Este proceso es catalizado por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO). La Fase de producción se caracteriza por la obtención de los principales productos de la fotosíntesis (Carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos), mediante el proceso de fotosíntesis se pueden formar diferentes productos dependiendo del contenido de CO_2 , O_2 y nutrientes del medio (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

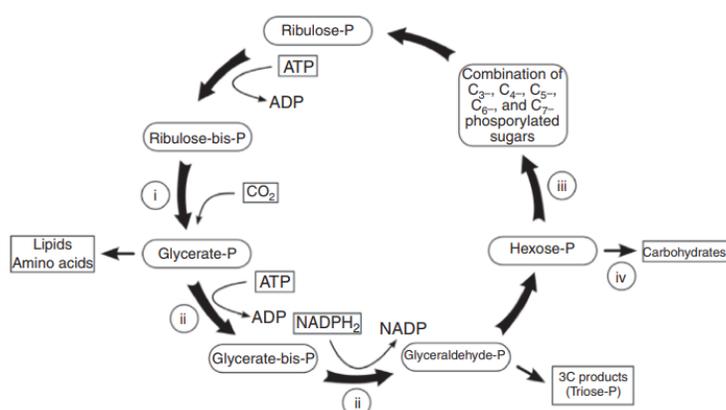


Figura 5. Ciclo de Calvin **i)** Fase de carboxilación, **ii)** Fase de reducción, **iii)** Fase de regeneración, **iv)** Fase de producción

Fuente: (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.7.1.3 Foto-respiración

Es un proceso antagónico a la fase de carboxilación del ciclo de Calvin, en donde el carbono orgánico se transforma en CO_2 sin ninguna ganancia metabólica. La enzima RuBisCO actúa como oxigenasa, cataliza la reacción del CO_2 con bifosfato de ribulosa para formar fosfoglicolato. Después de la desfosforilación, el glicolato se convierte a serina, amoníaco y CO_2 . La fotorespiración depende de las concentraciones de O_2 y CO_2 . Al presentar una alta irradiación lumínica, con un nivel de O_2 alto y una baja concentración de CO_2 se estimula el proceso. Para

obtener rendimientos adecuados en cultivos de microalgas es necesario minimizar los efectos de la fotorrespiración (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

2.2.7.1.4 Pigmentos fotosintéticos

- **Clorofila:** El principal pigmento involucrado en la captación de la energía lumínica y la transformación en energía química es la clorofila *a*. Absorbe longitudes de onda de color rojo (650 a 700 nm) y azul (400 a 500 nm). Todas las clorofilas (*a*, *b* y *c*) tienen dos bandas predominantes para la absorción de luz, azul o verde-azul (450 a 475 nm) y rojo (630 a 675 nm). La *clorofila a* es el centro de la reacción de los complejos pigmento - proteína en organismos foto autótrofos. En la captación de luz está acompañada por *clorofila b* y *c* denominados pigmentos antena accesorios, los cuales extienden el rango de absorción de la luz (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

- **Carotenoides:** Los carotenoides tienen un rango de absorción de la luz entre los 400 a 500 nm resultando en el color amarillo-anaranjado. Se dividen carotenos (α -caroteno, β -caroteno) y xantofilas (luteína, zeaxantina, fucoxantina, peridinina). Los carotenoides tienen varias funciones en el proceso fotosintético, recolectan la luz y la transfieren a la clorofila además son moléculas indispensables para la protección contra la irradiación excesiva de luz (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

inorgánica del dióxido de carbono (CO_2), el CO_2 reacciona con moléculas de agua (H_2O) (Markou, Vandamme, & Muylaert, 2014).

2.3.1.2 Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento importante en la producción de biomasa en microalgas, el contenido de nitrógeno en la biomasa puede variar entre 1 al 10 %. La deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo puede generar decoloración de las células debido a la disminución de clorofila y al aumento de carotenoides. El nitrógeno en el medio se suministra por lo general como nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Cuando el amonio se usa como fuente de nitrógeno puede disminuir significativamente el pH del medio debido a la liberación de iones de hidrógeno (H^+), cuando se suministra nitrato como única fuente de nitrógeno el pH del medio aumenta (Richmond, 2004).

2.3.1.3 Fósforo

El fósforo es indispensable para el crecimiento y el desarrollo de varios procesos celulares en microalgas como la biosíntesis de ácidos nucleicos, ADN, transferencia de energía. El fósforo se suministra de forma preferida como orto fosfato (PO_4^{2-}). La biomasa de las microalgas contiene menos del 1 % de P, sin embargo es un factor limitante en el cultivo de microalgas ya que interviene en el metabolismo celular desde el almacenamiento de energía hasta en la estructura celular, señalización celular y en el material genético de las microalgas (Borowitzka, 2018). El suministro de fósforo externo afecta la producción de biomasa, especialmente el contenido de lípidos y carbohidratos (Richmond, 2004).

2.3.1.4 Macro y micro nutrientes

En la nutrición de las microalgas además del carbono, nitrógeno y potasio son importantes macronutrientes como Na, Fe, Mg, Ca y en cantidades menores micronutrientes como S, B, Cu,

Mn, Zn, Mo, Co, Se, Fe, que se ven reflejados en la composición elemental de las microalgas. Muchos de estos elementos actúan en las reacciones enzimáticas para biosíntesis de muchos compuestos (Richmond, 2004). El magnesio es un elemento esencial para la producción de biomasa, participa en procesos como la fijación del carbono y reacciones de ATP y en varios procesos enzimáticos y el contenido en microalgas oscila entre el 0.35% al 0.7 %. El calcio es un elemento indispensable para la formación de la pared celular en microalgas e interviene en el proceso de división celular y varía entre 0.2 a 1.4 % (Markou, Vandamme, & Muylaert, 2014).

Tabla 1

Combinación de fertilizantes que pueden ser utilizados como medio de cultivo en microalgas

Formulación	Concentración en (mg L ⁻¹)				
	A*	B*	C*	D*	E*
Sulfato de amonio	150	300	100	-	-
Urea	7,5		10-15	-	12-15
Superfosfato de calcio	25	50	-	-	-
N:P 16/20 fertilizante	-	-	10-15	-	-
N:P: K 16-20-20	-	-	-	12-15	-
N:P: K 14-14-14	-	-	-	-	30

A, B, C, D*=Formulación de medios de cultivo con fertilizantes simples.

Fuente: (Sorgeloos, 1996)

2.3.2 Luz

Tanto plantas como microalgas utilizan la radiación fotosintéticamente activa o radiación (PAR) comprendida entre 400 a 700 nm para efectuar proceso de fotosíntesis. La energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, por este motivo un fotón de luz azul (alrededor de 400 nm) posee más energía que el de la luz roja (alrededor de 700 nm) (Masojídek, Torzillo, & Koblížek, 2013).

De acuerdo a la teoría cuántica, la energía lumínica se entrega en forma de pequeñas partículas denominadas fotones o quantum. La intensidad de lumínica es expresada en lux ($\text{lm}\cdot\text{m}^{-2}$), también se expresa como densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) que inciden en una superficie plana por unidad de tiempo ($\mu\text{mol}(\mu\text{mol})\text{ quantum m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

El crecimiento en microalgas está directamente relacionado con la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), en bajos niveles de (PPFD) la producción de oxígeno incrementa mientras que en (PPFD) superiores a ($100\ \mu\text{mol quantum m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) la tasa de producción de oxígeno disminuye y de esta manera la microalga alcanza su máxima tasa de producción de oxígeno, este fenómeno se denomina saturación de luz en la fotosíntesis (Figura 7) (Masojídek, Torzillo, & Koblízek, 2013).

La intensidad lumínica juega un rol importante en el cultivo de microalgas, para esto hay que tener presente el volumen del cultivo y la densidad celular. En cultivos profundos la intensidad lumínica debe incrementarse para penetrar a través del cultivo. Se recomienda que la intensidad lumínica debe oscilar entre mil a 10 mil lux dependiendo el volumen del cultivo. En el caso del uso de iluminación artificial se debe suplementar como mínimo 18 horas luz /día para un desarrollo normal del fitoplancton (Sorgeloos, 1996).

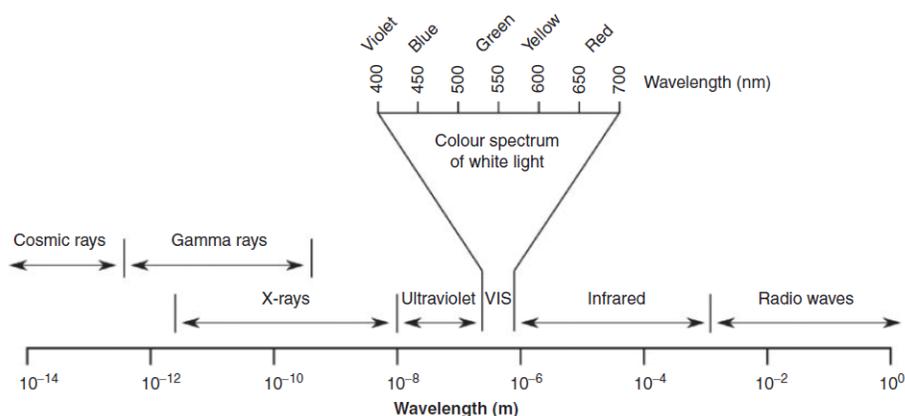


Figura 7. El espectro de radiación electromagnética que muestra, en particular, el espectro de luz visible, Radiación fotosintéticamente activa (PAR) (400 a 700 nm).

Fuente: (Masojídek, Torzillo, & Koblížek, 2013).

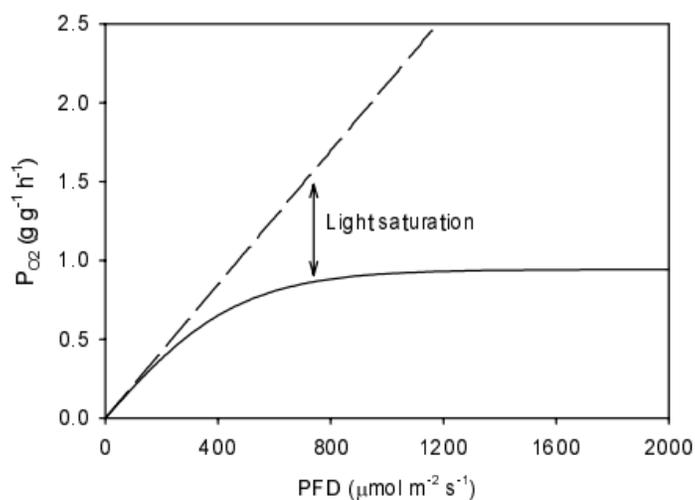


Figura 8. Tasa de producción de oxígeno específica ($P_{O_2}\ g\ g^{-1}\ h^{-1}$) en base proteica en función de la densidad de flujo de fotones o quantum ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$).

Fuente: (Janssen, 2002).

2.3.3 Potencial de hidrógeno (pH)

La mayor parte de cultivos de microalgas se desarrollan en un rango de pH entre 7 y 9, el pH regula la disponibilidad de carbono además altera la disponibilidad de metales traza y nutrientes esenciales para el desarrollo niveles extremos de pH superiores a 11 pueden afectar los procesos

fisiológicos como la fotosíntesis (Surindra & Verma, 2018). Un manejo inadecuado de este parámetro puede ocasionar la interrupción de muchos procesos como la división celular (Sorgeloos, 1996).

La regulación del pH se consigue mediante la adición de CO_2 o aireación, el proceso de fotosíntesis produce un aumento del nivel de pH debido a la acumulación de OH^- y la reducción del CO_2 disuelto, (Ruiz, 2011). El pH puede afectar varios procesos especialmente la biodisponibilidad de nutrientes en el medio en función a sus constantes de equilibrio ácido-base. Uno de los casos representativos es el equilibrio de los compuestos de carbono: $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$. El incremento del pH puede ocasionar la eliminación de fósforo por precipitación o eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco (Lores, 2015).

2.3.4 Aireación

La aireación permite una distribución homogénea de los nutrientes, evita la sedimentación del cultivo, mejora el intercambio de gases en el medio de cultivo y permite que la población celular reciba la misma cantidad de luz (Sorgeloos, 1996). Es importante evaluar el contenido del oxígeno disuelto debido a que concentraciones altas de oxígeno pueden ocasionar la inhibición de la fijación del carbono (CO_2) por parte de enzima RuBisCO efecto que activa el proceso de foto-respiración. (Ruiz, 2011). El suministro de aireación externa por burbujeo permite asegurar el aporte del CO_2 y la remoción del oxígeno fotosintético para evitar la sobresaturación de O_2 y permite un desarrollo eficiente de la fotosíntesis (García, 2014).

2.3.5 Salinidad

La mayor parte de especies de microalgas se desarrollan mejor en condiciones salinas menores a las condiciones naturales de sus hábitats por lo cual se ha determinado que salinidades entre 20

a 24 g L^{-1} son óptimas para el desarrollo normal de la mayor parte de microalgas cultivadas de origen marino (Sorgeloos, 1996).

2.3.6 Temperatura

La mayor parte de especies de microalgas toleran rangos de temperatura entre los 16 y 27°C . Temperaturas inferiores a 16°C disminuyen el crecimiento celular del cultivo mientras que temperaturas superiores a 35°C son letales para una gran cantidad de especies (Sorgeloos, 1996). La temperatura es un factor importante en el proceso de fotosíntesis ya que interviene en la fijación del carbono (CO_2) (García, 2014). En el estudio realizado por (García, 2014) se evaluaron diferentes temperaturas en el cultivo de *Chlorella vulgaris* en donde se determinó que a una temperatura de 30°C la fijación del carbono ($\text{CO}_2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y la productividad de la biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) disminuyen al 50% en comparación de los valores obtenidos en temperaturas de 20 y 25°C .

2.4 Fases de crecimiento

2.4.1 Fase de adaptación (1)

También denominada fase de adaptación, en esta etapa el cultivo puede verse afectado por factores como la temperatura, pH e iluminación motivo que puede ocasionar un retardo en el crecimiento de la fase inicial del cultivo (Arredondo & Voltolina, 2007).

2.4.2 Fase de aceleramiento (2)

En esta etapa los componentes estructurales de las células se desarrollan secuencialmente empezando por el Ácido ribonucleico (RNA), proteínas y crecimiento celular, en último lugar se desarrolla la concentración celular (Arredondo & Voltolina, 2007).

2.4.3 Fase exponencial (3)

En esta etapa la división y crecimiento celular alcanzan su máximo desarrollo y se mantiene constante debido a la ausencia de factores limitantes (Arredondo & Voltolina, 2007). En el estudio realizado por (Zhang, Amendola, Hewson, Sommerfeld, & Hu, 2012) se evaluó el desarrollo de *Chlorella zofingiensis*, en donde se pudo apreciar que en la fase exponencial las células presentaron un diámetro de 3 micrómetros (μm), menor que en otras etapas, sin embargo el desarrollo celular y peso seco fue 10 veces mayor que en otras etapas.

2.4.4 Fase de desaceleración (4)

En esta etapa existe una menor disponibilidad de nutrientes por lo cual las condiciones del cultivo no son óptimas para el crecimiento, por consiguiente, la división celular se reduce debido a la concentración celular alta (Arredondo & Voltolina, 2007).

2.4.5 Fase estacionaria (5)

En esta fase la concentración celular y los componentes de la biomasa no sufren cambios relevantes por lo cual la natalidad y mortalidad son similares. Este comportamiento se debe a una alteración de factores como el pH, iluminación o falta de disponibilidad de algún nutriente (Arredondo & Voltolina, 2007). En el estudio realizado por (Zhang, Amendola, Hewson, Sommerfeld, & Hu, 2012) al evaluar la fase estacionaria con *Chlorella zofingiensis*, se observó que células presentaron un diámetro de 3.25 μm mayor que en la fase exponencial, sin embargo, el desarrollo celular y peso seco disminuyó.

2.4.6 Fase de muerte (6)

La fase de muerte se deriva de la ausencia de nutrientes disponibles en el medio lo cual provoca muerte o lisis celular, en esta etapa hay una disminución en la división celular y un incremento en la mortalidad, esto produce una disminución de la biomasa esenciales (Arredondo & Voltolina, 2007).

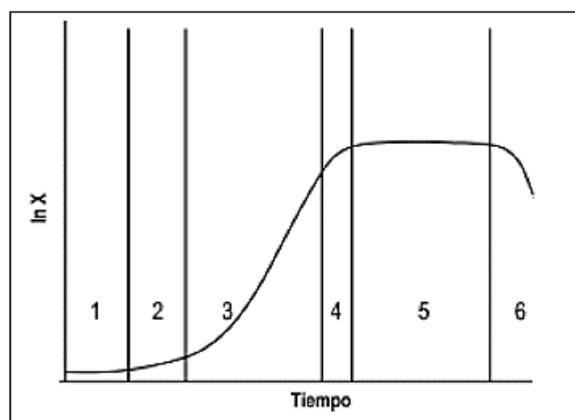


Figura 9. Fases del crecimiento celular en microalgas.

Fuente: (Arredondo & Voltolina, 2007).

2.5 Manejo del cultivo

2.5.1 Control de contaminación

Es importante mantener axénico el cultivo de microalgas para evitar que otros organismos como bacterias interrumpen sus procesos fisiológicos. Para observar si el cultivo posee contaminación bacteriana se puede agregar el medio del cultivo o un sustrato orgánico como glucosa, sacarosa o peptona al 1-2% (p/v) o mediante agar-agar (15 mil mg L⁻¹). Los cultivos se incuban por 24 horas a 2 semanas en caso de presentar contaminación bacteriana se observarán colonias. Es importante realizar esta técnica para verificar la pureza del cultivo (Arredondo & Voltolina, 2007).

Para el control de la contaminación generada por microorganismos se pueden utilizar antibióticos que actúan sobre hongos y bacterias generando un efecto selectivo lesionando la membrana celular de estos organismos e inhibiendo la síntesis de compuestos celulares indispensables para un correcto metabolismo se han implementado antibióticos como la penicilina (100 mg/L), Sulfato de gentamicina (25 mg/L) en varias especies de microalgas. En *Chlorella* se ha controlado a la bacteria predatoria *Vampirovibrio chlorellavorus* con una exposición de 15 minutos bajo un pH de 3,5 en presencia de 0.5 g / L de acetato tratado con ácido clorhídrico, el efecto del shock producido por el pH actuó como un efecto bactericida en el cultivo (Ganuza, Sellers, Bennett, Lyons, & Carney, 2016).

2.5.2 Cultivo discontinuo

El cultivo discontinuo consiste en una sola inoculación de células en un contenedor con fertilizante. En esta técnica el cultivo de microalgas se va escalando a recipientes con volúmenes de cultivo más grandes antes de alcanzar la fase estacionaria y el mayor volumen del cultivo se lo lleva a una densidad máxima para proceder a cosechar la biomasa. (Sorgeloos, 1996).

Los cultivos madre son considerados los volúmenes hasta 250 mL, se mantienen a temperatura baja, iluminación sin suministro de aire y CO₂. Los cultivos indicadores (250 mL a 4 litros) se cultivan entre 7 a 14 días, con temperaturas más altas e intensidad de luz mayor, además se suministra aire con CO₂. Posteriormente se toma una pequeña parte del cultivo para iniciar un cultivo a escala intermedia (4 a 20 litros), en esta fase se puede suministrar como alimento para larvas o para iniciar un cultivo a gran escala que manejan volúmenes superiores a 50 litros (Helm, 2004).

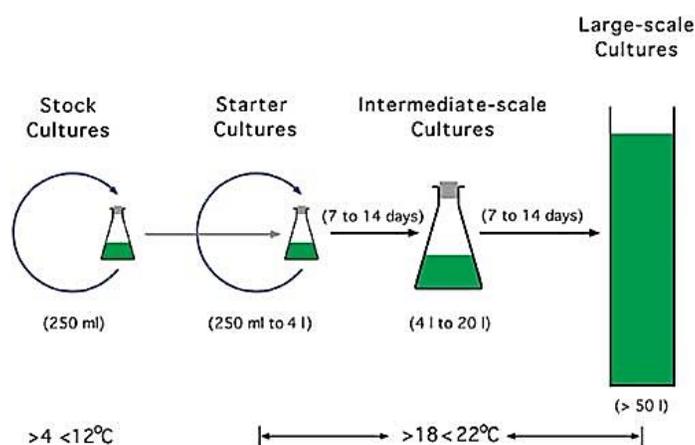


Figura 10. Esquema de producción de un cultivo discontinuo en microalgas

Fuente: (Helm, 2004).

2.6 Promotores de crecimiento vegetales

Los promotores de crecimiento vegetales o fitohormonas son una clase de moléculas pequeñas que se desempeñan como mensajeros químicos para coordinar procesos celulares en plantas, algas, hongos y bacterias. Los sistemas de los promotores de crecimiento involucran vías de biosíntesis que producen las fitohormonas y vías de traducción de señales que producen los efectos de estas fitohormonas. En el grupo de las fitohormonas se encuentran las auxinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno y giberelinas. El papel funcional de las fitohormonas en microalgas todavía no se ha definido completamente, sin embargo, en estudios moleculares realizados en la microalga *Nannochloropsis* sugieren que el ácido abscísico y citoquininas cumplen con funciones fisiológicas similares a las plantas (Lu & Xu, 2015).

2.7 Ácido indol 3-acético (AIA)

El ácido indol 3-acético (AIA) fitohormona involucrada en diferentes procesos fisiológicos de plantas y algas como el crecimiento, división celular, biosíntesis de etileno.

El AIA es una auxina de origen natural presente en todas las plantas vasculares y en algas verdes del género *Chlorella* y *Scenedesmus*. La concentración de esta fitohormona es relativamente menor en algas verdes comparado con plantas (Piotrowska & Bajguz, 2014).

Las auxinas poseen un efecto directo en la división celular, en la transición celular de estado latente al estado activo, además estimulan la respiración. En microalgas las auxinas son el ácido indol 3-acético (AIA) y el ácido indol 3 butanóico (IBA). El AIA se sintetiza en cloroplastos y moléculas como la glucosa, oligosacáridos, ácidos nucleicos y proteínas (Xingfeng, Bartocci, Yunjun, Fantozzi, & Yan, 2018).

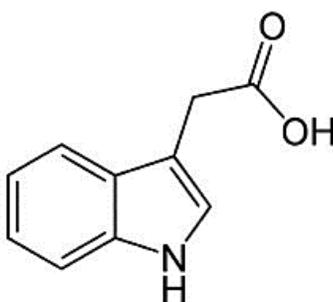


Figura 11. Estructura del ácido indol 3-acético (AIA)

Fuente: (Xingfeng, Bartocci, Yunjun, Fantozzi, & Yan, 2018).

2.7.1 Efecto de Auxinas en microalgas

Las auxinas intervienen en crecimiento y metabolismo de las microalgas. En pequeñas concentraciones influye en el crecimiento celular y producción de biomasa. Además, pueden estimular el contenido de lípidos, biosíntesis de pigmentos y proteínas solubles en las microalgas (Xingfeng, Bartocci, Yunjun, Fantozzi, & Yan, 2018).

En *Chlorella pyrenoidosa* se ha identificado, que las auxinas estimulan la producción de proteínas solubles en el agua, además de los contenidos de clorofila a y b.

Estudios sobre la aplicación de AIA exógeno en el cultivo de *C. vulgaris* evidencian un incremento significativo en la multiplicación celular (Antoun, Bashan, & de-Bashan, 2008).

Piotrowska & Bajguz, (2014) mencionan que el efecto de las auxinas esta mediado por enzimas secuestradoras de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que responden a la presencia de hormonas endógenas (Ácido indol 3-acético) aumentando sus niveles de actividad, esta respuesta puede estar relacionada a la activación del proceso de organogénesis, además señala que el control de ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la maquinaria celular antioxidante pueden mediar las vías de señalización entre las auxinas exógenas, lo cual induce respuestas fisiológicas en microalgas como la división celular y producción de metabolitos (proteínas, lípidos, pigmentos etc.), sin embargo recalca que esta hipótesis debe ser validada mediante estudios moleculares.

2.7.2 Rutas biosintéticas de las auxinas en microalgas

En el estudio realizado por (Stirk, y otros, 2014) en donde se evaluaron auxinas endógenas en *Chlorella minutissima* se detectó triptófano (TRP), y el precursor antranilato (ANT) en altas concentraciones. Lo cual permite inferir que existe una ruta dependiente de triptófano (TRP) en *Chlorella minutissima*. TRP es precursor de vías biosintéticas como compuesto de defensa y proteínas en plantas vasculares.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar de investigación

3.1.1 Ubicación Política

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos de la carrera de Ingeniería Agropecuaria-IASA 1, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicada en la parroquia San Fernando, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

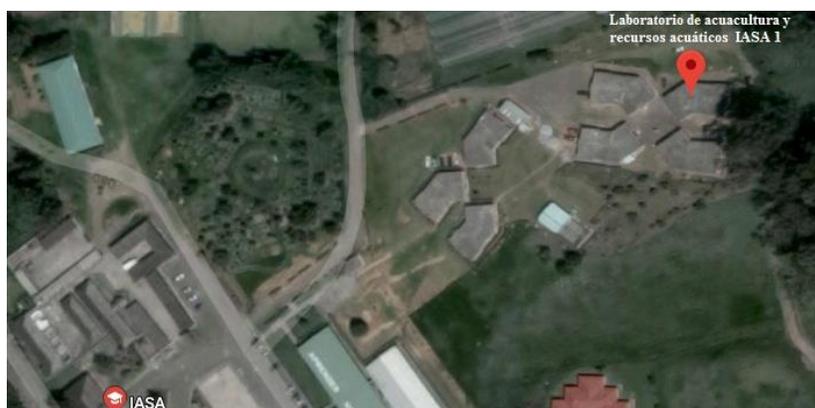


Figura 12. Ubicación laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos IASA 1

Fuente: Google maps, 2018

3.1.2 Ubicación Geográfica

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de acuicultura y recursos acuáticos ubicado en el Bloque 6 de la Hacienda el Prado-IASA 1 de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizado en las siguientes coordenadas geográficas: Longitud 78°24'44" O, latitud 0°23'20" S.

3.1.3 Condiciones ambientales

El presente estudio se realizó bajo una temperatura controlada de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ (Arce , 2009).

3.2 Materiales

3.2.1 Materiales de laboratorio

Tubos de ensayo de 15 mL, matraces Erlenmeyer de 250 mL, 36 botellones plásticos de 6 litros, 10 metros de manguera para aireación, puntas de pipeta de 1000 μ L, 200 μ L, pipetas de precisión de 10 μ L a 1000 μ L, cámara de Neubauer, mechero.

3.2.2 Materiales Biológicos

Cepas de microalgas *Chrorella*, Biotipo 1, Biotipo 2 y Biotipo 3, detectadas y aisladas en el proyecto de investigación PIC 005-2015 en el Laboratorio de Recursos Acuáticos y Acuicultura de la ESPE.

3.2.3 Equipos y programas

Microscopio óptico, cámara de flujo laminar, espectrofotómetro (Termo spectronic genesys 20), balanza electrónica (M-220D), centrífuga MX 8624, Vórtex, pH-metro HANNA, filtro de jeringa 0.22 μ m, 9 motores doble salida (Acuario), refrigerador, computador, cámara Digital 2.0mpx Motic, programa Motic Images Plus 2.0, programa ImageJ (Conteo celular), Sonicado Branson 1510, termorreactor.

3.2.4 Reactivos

Fertilizante foliar Nitrofoska (3:1:1), Agar Agar, Agua destilada, Ácido indol 3-acético (Sigma-Aldrich), etanol absoluto, albúmina de bovino (BSA), Na_2CO_3 , NaOH, CuSO_4 , tartrato de K, solución de folin ciocalteu, metanol, cloroformo.

3.3 Métodos

La investigación se realizó en laboratorio y se dividió en dos fases:

- **Primera fase de laboratorio:** Se incorporó las soluciones de trabajo de ácido indol 3-acético de (0, 10, 30,50 mg L⁻¹) en los tres biotipos de *Chlorella*; se evaluó el crecimiento (células mL⁻¹), velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación, pH, biomasa (peso seco), y se realizó un análisis bromatológico para determinar el contenido de proteínas, lípidos, carotenos y clorofila.

-**Segunda fase de laboratorio:** Se procedió a seleccionar los mejores tratamientos de ácido indol 3-acético en los 3 biotipos de *Chlorella*, y se los comparó con un testigo (0 mg L⁻¹), se evaluó el crecimiento (células mL⁻¹), velocidad específica de crecimiento, pH, biomasa (peso seco), y se realizó un análisis bromatológico para determinar el contenido de proteínas, lípidos, carotenos y clorofila.

3.3.1 Purificación de *Chlorella* andina del Ecuador Biotipos 1, 2,3

Los biotipos de *Chlorella* fueron recolectados en la reserva Cayambe Coca (Biotipo 1 y 2) (Villafuerte, 2016), (Pachacama Moreno, 2016) y en el sistema lacustre del Quilotoa (Biotipo 3) (Tipan, 2017).El proceso de purificación se realizó en cajas Petri estériles implementando medio de cultivo constituido por una base inorgánica constituido por fertilizante foliar Nitrofoska (3:1:1) (1 g L⁻¹) suplementado con (15 g L⁻¹) de agar-agar. Una vez sembrados los diferentes biotipos se incubaron los medios de cultivo a una temperatura ambiente de 19 °C e irradiación de (78,8 μmol quantum m⁻² s⁻¹); posterior a los 3 días se evaluó el desarrollo celular y la presencia de contaminación.

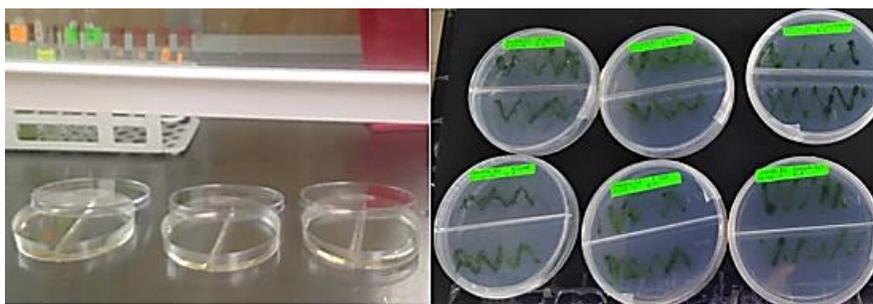


Figura 13. Siembra *Chlorella* Biotipos 1, 2,3 en medio solido

3.3.2 Masificación de microalgas

Para incrementar la biomasa de las microalgas se aplicó un cultivo discontinuo (incrementando el volumen del cultivo paulatinamente). La fertilización se la realizó con Nitrofoska foliar (30-10-10) a una concentración de (1 g L⁻¹). Inicialmente los cultivos se manejaron en tubos de ensayo de 15 mL, se evaluó hasta llegar a una concentración de 2 x 10⁶ células mL⁻¹, posteriormente colocó los cultivos en matraces de 250 mL con 100 mL de fertilizante foliar. Al haber alcanzado una concentración de 3 x 10⁶ de células mL⁻¹ se procedió a incrementar el volumen de fertilizante a 250 mL y se evaluó el crecimiento celular hasta alcanzar una concentración de 8 x 10⁶ de células mL⁻¹.



Figura 14. Cultivos de *Chlorella*, A) Cultivo en tubos de ensayo, B) Cultivo en matraces con 100 ml de fertilizante, C) Cultivo en matraces con 250 ml de fertilizante.

3.3.3 Preparación del ácido indol 3- acético para las dos fases de laboratorio

Se preparó una solución madre de AIA ácido indol-3 acético de 1000 mg L⁻¹ implementando 20 mg de AIA y 20 ml de etanol absoluto, la solución se homogenizó usando vórtex y se esterilizó por filtración mediante un filtro de jeringa de 0,22 µM. Posteriormente se procedió a preparar las soluciones de trabajo de (10; 30; 50 mg L⁻¹) (Udayan & Arumugam, 2017).

3.3.4 Implementación y seguimiento de la primera fase de laboratorio

Se inoculó 12×10^5 células mL⁻¹, en botellones de 6 litros los cuales contaron con 4 litros de agua purificada y fertilizante foliar Nitrofoska (30-10-10) (1 g L⁻¹), se suministró aireación constante (2 L/min, Presión 0.020 megapascuales (Mpa)), iluminación artificial con una irradiación de (78,8 µmol quantum m⁻² s⁻¹) y se manejó una temperatura ambiente de 19 °C, las soluciones de trabajo de AIA se colocaron en el séptimo día durante la fase de aceleración de los cultivo de acuerdo al diseño experimental planteado. El experimento se evaluó durante 15 días en donde se recopilaron parámetros productivos como el pH, densidad celular y peso seco.

3.3.4.1 Aplicación de las soluciones de trabajo de AIA

Las soluciones de trabajo se aplicaron el séptimo día de desarrollo durante la etapa de aceleración para lo cual se manejó una relación v/v menor a 1 % para evitar daños a nivel celular, tomando en cuenta estas consideraciones se incorporó 1 mL de las soluciones de trabajo de AIA (10; 30; 50 mg L⁻¹) y se aplicó de acuerdo al diseño experimental planteado (Piotrowska & Bajguz, 2014).

Tabla 2
Cálculo relación % v/v primera fase de laboratorio

Volumen		Porcentaje
Botellón	(4000 mL)	100 %
Ácido indol 3-acético	(1 mL)	$X=(1 \text{ mL} \times 100\%)/4000 \text{ mL}= 0.025\%$

3.3.4.2 Implementación de la segunda fase de laboratorio

Culminada la primera fase del estudio se procedió a seleccionar los mejores tratamientos de ácido indol 3-acético para cada biotipo de *Chlorella* y se los comparó con un testigo (0 mg L^{-1}). Se manejó un inóculo 50×10^5 células/ml, en recipientes plásticos de 20 litros los cuales contaron con 8 litros de agua purificada y fertilizante foliar Nitrofoska (30-10-10) (1 g L^{-1}), se suministró aireación constante (4 L/min , Presión 0.020 Mpa), iluminación artificial con una irradiación de ($78,8 \mu\text{mol quantum m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y se manejó una temperatura ambiente de $19 \text{ }^\circ\text{C}$.

En la fase experimental se realizó un plan de manejo del cultivo en donde se realizaron 2 aplicaciones de las soluciones de trabajo seleccionadas en los días 7 y 14 para evaluar la respuesta del desarrollo celular frente a varios estímulos por parte del promotor de crecimiento vegetal (AIA).

En las dos aplicaciones de ácido indol 3-acético se manejó una relación % v/v de 0.025% al igual que en la primera fase de laboratorio (Tabla 2).

3.3.5 Variables del estudio

En las dos fases experimentales se evaluaron las siguientes variables:

3.3.5.1 Potencial de hidrógeno (pH):

La medición del pH se realizó cada dos días, mediante un pH metro digital con lo cual se evaluó la variación de este parámetro en los tratamientos evaluados.

3.3.5.2 Concentración celular y densidad óptica

El conteo celular se realizó mediante una cámara de Neubauer, contando los 4 cuadrantes (A, B, C, D). El conteo celular se lo realizó cada tres días en la primera fase experimental. Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración celular (células mL⁻¹) (Arredondo & Voltolina, 2007).

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

Dónde:

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

La densidad óptica se determinó mediante un espectrofotómetro (Termo spectronic genesys 20) calibrado a 550 nm de absorbancia el parámetro se midió cada dos días en ambas fases de estudio. Los datos de concentración celular y densidad óptica permitieron elaborar curvas de calibración para cada tratamiento comparando la concentración celular (células mL⁻¹) y la densidad óptica, metodología que permitió obtener las siguientes ecuaciones lineales, en donde y=densidad celular (Células mL⁻¹), x=Absorbancia (550 nm).

Tabla 3*Ecuaciones lineales para determinar densidad celular células mL⁻¹*

Tratamiento	Descripción	Ecuación	R ²
T01	B1 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y^1 = 17.322x^2 + 0.0066$	R ² = 0.9942
T02	B1 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 17.313x + 5.1536$	R ² = 0.9921
T03	B1 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 17.098x + 3.98$	R ² = 0.9969
T04	B1 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 17.013x + 0.5691$	R ² = 0.9993
T05	B2 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 19.972x + 0.0134$	R ² = 0.9971
T06	B2 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 13.656x + 5.1923$	R ² = 0.99
T07	B2 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 11.34x + 3.5726$	R ² = 0.9964
T08	B2 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 15.777x + 5.2698$	R ² = 0.9959
T09	B3 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 17.718x + 0.0019$	R ² = 0.9981
T10	B3 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 12.485x + 5.4866$	R ² = 0.9957
T11	B3 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 17.689x + 3.0437$	R ² = 0.9963
T12	B3 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 21.371x + 0.9693$	R ² = 0.996

y^1 = Densidad celular, x^2 = Absorbancia 550 nm, R²= Coeficiente de determinación

3.3.5.2.1 Velocidad específica de crecimiento (Células/hora) (μ)

Velocidad específica o tasa de crecimiento específico (μ) se determinó mediante la siguiente fórmula: (Asuthkar, Gunti, Rao, & Yadavalli, 2016)

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

Dónde:

- μ = velocidad de crecimiento (células /hora)
- t_1, t_0 = Tiempo final e inicial
- X_1, X_0 = Densidad celular final e inicial en fase logarítmica

3.3.5.2.2 Tiempo de duplicación (Células horas⁻¹) (Td)

Tiempo de duplicación (Td) se determinó mediante la siguiente fórmula: (Asuthkar, Gunti, Rao, & Yadavalli, 2016)

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

Dónde:

- **Td** = Tiempo de duplicación (Células horas⁻¹)
- **μ** = velocidad de crecimiento (células /hora)

3.3.5.3 Determinación peso seco total (g L⁻¹)

Para determinar el peso seco (g L⁻¹) se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL previamente lavados con agua destilada y secados. Posteriormente se número y se pesó los tubos de ensayo en una balanza analítica de 5 dígitos para obtener el peso seco del tubo sin muestra (**PST**). Para obtener el peso del tubo con muestra seca (**PSTM**), se homogenizo la biomasa de cada tratamiento y se colocaron 15 mL de muestra, se procedió a centrifugar los tubos a 2000 rpm durante 10 min, seguido se eliminó el sobrenadante con una jeringa conservando el sedimento, finalmente se colocaron los tubos de ensayo en una estufa a 65 °C durante 24 horas y se realizó el pesaje de los tubos.

Para obtener el peso seco total (**PST**) (g L⁻¹) se aplicó la siguiente ecuación:

$$\mathbf{PST} \text{ (g L}^{-1}\text{)} = (\mathbf{PSTM} - \mathbf{PST}) / \mathbf{VC}$$

Donde:

PST=Peso seco total

PSTM= peso del tubo con muestra seca

PST= peso seco del tubo sin muestra

VC=Volumen de muestra centrifugada

El procedimiento se realizó cada 5 días en ambas fases experimentales, lo cual permitió elaborar curvas de calibración para cada tratamiento, en donde se comparó las medidas de peso seco obtenidas y la absorbancia del cultivo medida a 550 nm, lo cual permitió obtener las siguientes ecuaciones lineales en donde y =peso seco ($g L^{-1}$), x =Absorbancia (550 nm).

Tabla 4

Ecuaciones lineales para determinar el peso seco $g L^{-1}$

Tratamiento	Descripción	Ecuación	R²
T01	B1 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3398x - 0.0159$	$R^2 = 0.9979$
T02	B1 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3575x + 0.0681$	$R^2 = 0.9906$
T03	B1 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3797x + 0.0359$	$R^2 = 0.9992$
T04	B1 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.1698x + 0.0963$	$R^2 = 0.9965$
T05	B2 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3576x + 0.0005$	$R^2 = 0.9947$
T06	B2 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.376x + 0.0228$	$R^2 = 0.9919$
T07	B2 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3463x + 0.0183$	$R^2 = 0.999$
T08	B2 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3802x + 0.0527$	$R^2 = 0.9939$
T09	B3 (0 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.2625x + 0.0426$	$R^2 = 0.997$
T10	B3 (10 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3342x + 0.0318$	$R^2 = 0.9998$
T11	B3 (30 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3465x + 0.0567$	$R^2 = 0.9984$
T12	B3 (50 mg L ⁻¹ AIA)	$y = 0.3162x + 0.0166$	$R^2 = 0.9972$

y^1 = Peso seco, x^2 = Absorbancia 550 nm, R^2 = Coeficiente de determinación

3.3.5.4 Cosecha de la biomasa para análisis bromatológicos

Para cosechar la biomasa se procedió a centrifugar el contenido de los tratamientos a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos. El residuo se depositó en cajas Petri de vidrio estériles y se secó en una estufa a 35 °C durante 48 horas, la biomasa seca se colocó en

un mortero y se trituro hasta obtener una textura fina, posteriormente la biomasa se colocó en tubos falco de 15 ml y se los almaceno en un refrigerador a 4°C.

3.3.5.5 Contenido de Proteína

Para determinar el contenido de proteínas se empleó el método espectrofotométrico de Lowry , en donde se realizó una curva de calibración con sero albúmina de bovino (BSA),para lo cual se preparó una solución concentrada de 300 µg/mL (BSA) (Figura 18) ,a partir de la cual se realizó una gradiente de concentración de 0 a 180 µg/mL empleando agua ultra pura para diluir BSA ,seguido se aplicó las soluciones **prestock** (Na₂CO₃ al 2 % (p/v) en NaOH 0.1 N) , **lowry 1**(solución pre stock + CuSO₄ al 5 % y tartrato de K al 1 % 1:1) y **lowry 2** (solución 1:1 de Folin: H₂O destilada).

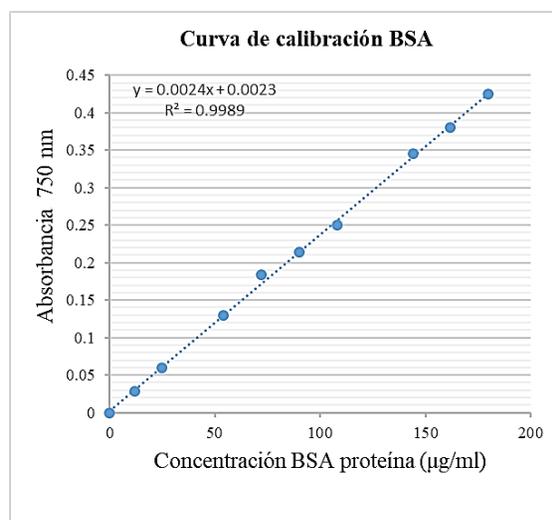


Figura 15. Curva de calibración empleando BSA

Una vez elaborada la curva de calibración con la proteína estándar BSA se procedió a cuantificar el contenido de proteínas mediante la siguiente metodología:

- Para determinar el contenido de proteína de los tratamientos se pesó 5 mg de cada muestra, se colocó en un tubo lavado con jabón libre de fosfatos y con HCL al 10 %, se procedió a etiquetar los tubos.
- Se procedió a colocar 5 mL de NaOH al 0.1 N en los tubos de ensayo
- Se obtuvo el extracto alcalino de las muestras implementando un termo baño aplicando hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N a una temperatura de 100 °C por 60 minutos, transcurrido el período se procedió a retirar los tubos y se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente
- Se procedió a centrifugar la muestra a 3000 rpm por 15 min a 10 °C
- Se preparó una solución de Na₂CO₃ al 2 % (p/v) en NaOH 0.1 N (**Solución pre stock**).
- Se preparó una mezcla en relación 1:1 de CuSO₄ al 5 % y tartrato de K al 1 % (**solución 1**) y se procedió a mezclar, se dejó en reposo y se tomó el sobrenadante claro de la solución.
- Se agregó a cada muestra (extracto alcalino) 250 µL de la mezcla (**solución pre stock**) + (**solución 1**) en una proporción 50:1 (**solución lowry 1**).
- Se procedió a homogenizar la solución resultante mediante un vortex y se dejó reposar durante 10 min.
- Se agregó a la solución 500 µL de la solución 1:1 de Folin: H₂O destilada (**solución lowry 2**). Se agitó con vortex y se dejó reposar las muestras en oscuridad por 20 min.
- Se procedió a calibrar el espectrofotómetro a 750 nm, se colocó como blanco empleando el mismo tratamiento que las muestras, pero se utilizó 1 mL NaOH 0.1 N sustituyendo a la muestra.

Para la determinación de las proteínas totales se procedió aplicar la siguiente ecuación:

% Proteínas = [[(m x A_{750 nm}) / V_m] x V_E] / P_s x 100 donde:

P_s=Peso seco (muestra)

V_e=Volumen del extracto alcalino

V_m= Volumen de la muestra

A_{750nm}=Absorbancia 750nm

m= Pendiente de la curva de calibración con (BSA)

3.3.5.6 Lípidos

Para la extracción de lípidos se aplicó el método de Bling y Dyer modificado por (Ren, et al., 2017) para lo cual se siguió la siguiente metodología:

- Se pesaron 35 mg de biomasa y se colocaron en un tubo de ensayo de 15 mL (tubo 1). Seguido se adicionó 2 mL de metanol ,1 mL de cloroformo y 2 mL de agua destilada.
- La solución resultante fue tratada con ultrasonido en agua con hielo durante 20 minutos al terminar este período se adicionó 1 mL de cloroformo y se procedió a tratar con ultrasonido durante 10 minutos a la solución.
- Se procedió a incubar los tubos de ensayo durante 24 horas a 4 °C y protegidos de la luz.
- Se centrifugaron los tubos de ensayo a 2500 rpm durante 20 min se separó la fase inferior (Lípidos y cloroformo) y se colocó un tubo de ensayo de 15 ml etiquetado (Tubo 2).
- El pellet sobrante fue sometido a una nueva extracción aplicando la metodología mencionada anteriormente y la fase resultante conformada por (Lípidos y cloroformo)

y se colocó un tubo de ensayo de 15 ml etiquetado (Tubo 2) previamente pesado en una balanza digital de 5 dígitos.

- Se procedió a colocar los tubos de ensayo abiertos a temperatura ambiente cerca de un purificador de aire durante 4 días para evaporar el cloroformo de la muestra.
- Se procedió a colocar los tubos de ensayo en una estufa durante 6 horas a 35° C.

Para la determinación de lípidos totales se aplicó el método gravimétrico determinado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times ((\text{PTL} - \text{PTV}) / (\text{P}))$$

PTL = Peso del tubo con lípidos (en mg)

PTV = Peso del tubo vacío (en mg)

P = Peso de la muestra (en mg)

3.3.5.7 Determinación de carotenos, clorofila α y β

Utilizando la biomasa cosechada (g L^{-1}) se procedió a preparar las muestras para la determinación de los contenidos de carotenos y clorofila para ello siguió la siguiente metodología:

- Se pesaron 10 mg de cada tratamiento
- Se colocaron las muestras en tubos de ensayo de 15 ml, y se colocó 10 ml de metanol en cada tubo (99,9%)
- Se procedió a macerar las muestras durante 24 horas en ausencia de luz a temperatura ambiente (Tipan, 2017).

Una vez realizada la extracción de los pigmentos fotosintéticos se procedió a tomar las medidas de absorbancia de las muestras mediante un espectrofotómetro (Thermo spectronic genesys 20) calibrado a longitudes de onda de 480,652 y 665 nm.

La medición de clorofila α y β se realizó empleando la fórmula propuesta por (Miazek & Ledakowicz, 2013). Para la medición de carotenos se empleó la fórmula descrita por (Strickland & Parsons, 1972).

$$\text{Clorofila } \alpha \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 16.72 * A_{665} - 9.16 * A_{652}$$

$$\text{Clorofila } \beta \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 39.04 * A_{652} - 15.28 * A_{665}$$

$$\text{Caroteno} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A_{480} * \text{Vol Extracto}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

3.3.6 Diseño Experimental

3.3.6.1 Factores

En la primera fase experimental se evaluaron 3 biotipos de *Chrorella* (B1, B2, B3), 3 concentraciones de AIA (10; 30; 50 mg L⁻¹) y un testigo (0 mg L⁻¹) (Tabla 5). En la segunda fase experimental se evaluó la mejor concentración de AIA con respecto a la producción de biomasa (g L⁻¹) en cada biotipo de *Chrorella* (B1, B2, B3) y un testigo (0 mg L⁻¹) (Tabla 6).

Tabla 5
Factores y niveles de la investigación fase de laboratorio

Código	Biotipo de <i>Chlorella sp.</i>	Concentración de AIA	
		Código	mg L ⁻¹
B1	Biotipo 1	C1	0
B1	Biotipo 1	C2	10
B1	Biotipo 1	C3	30
B1	Biotipo 1	C4	50
B2	Biotipo 2	C1	0
B2	Biotipo 2	C2	10
B2	Biotipo 2	C3	30
B2	Biotipo 2	C4	50
B3	Biotipo 3	C1	0
B3	Biotipo 3	C2	10
B3	Biotipo 3	C3	30
B3	Biotipo 3	C4	50

Tabla 6
Factores y niveles de la investigación fase de campo

Código	Biotipo de <i>Chlorella sp.</i>	Concentración de AIA	
		Código	mg L ⁻¹
B1	Biotipo 1	C1	0
B1	Biotipo 1	C2	30
B2	Biotipo 2	C1	0
B2	Biotipo 2	C2	50
B3	Biotipo 3	C1	0
B3	Biotipo 3	C2	30

3.3.6.2 Tratamientos

En la primera fase experimental se evaluarán 3 tratamientos de ácido indol-3 acético (AIA) (10; 30; 50 mg L⁻¹) y un testigo (0 mg L⁻¹) en cada biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3), como se puede apreciar en la Tabla 7.

En la segunda etapa de la investigación se procedió a seleccionar el mejor tratamiento para cada biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3), y se lo comparó con un testigo (0 mg L⁻¹), como se puede apreciar en la Tabla 8.

Tabla 7

Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3 primera fase de laboratorio

Tratamiento	Códigos	Concentración AIA (mg L ⁻¹)
T01	B1C1	0
T02	B1C2	10
T03	B1C3	30
T04	B1C4	50
T05	B2C1	0
T06	B2C2	10
T07	B2C3	30
T08	B2C4	50
T09	B3C1	0
T10	B3C2	10
T11	B3C3	30
T12	B3C4	50

Tabla 8*Tratamientos Chlorella Biotipo 1, 2, 3 segunda fase de laboratorio*

Tratamiento	Códigos	Concentración AIA (mg L ⁻¹)
T01	B1C1	0
T02	B1C2	30
T03	B2C1	0
T04	B2C1	50
T05	B3C1	0
T06	B3C2	30

3.3.6.3 Tipo de diseño

En la primera fase de laboratorio se aplicó un diseño factorial 3 x 4 con un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones.

En la segunda fase de laboratorio se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones.

3.3.6.4 Características de las unidades experimentales.

En la primera fase de laboratorio se emplearán 12 botellones plásticos por biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3) con capacidad de 6 litros, cada botellón contará con 4 litros de agua purificada con medio de cultivo Nitrofoska (1 g L⁻¹) y un inóculo inicial de 12 x 10⁵ células mL⁻¹.

En la segunda fase de laboratorio se emplearán 8 recipientes plásticos por biotipo de *Chlorella* (B1, B2, B3) con capacidad de 20 litros, cada botellón contará con 15 litros de agua purificada con medio de cultivo Nitrofoska (3 g L⁻¹) y un inóculo inicial de 50 x 10⁵ células mL⁻¹.

3.3.6.5 Croquis del diseño experimental

El croquis experimental para las dos fases del estudio contará con una distribución aleatoria de tratamientos (Figura 16) (Figura 17).

T11	T12	T10
T07	T10	T02
T05	T03	T08
T03	T07	T01
T09	T05	T04
T10	T08	T05
T02	T04	T09
T04	T01	T07
T06	T09	T12
T01	T06	T11
T12	T02	T06
T08	T11	T03

Figura 16. Croquis experimental primera fase de laboratorio

T04	T05	T01	T06	T03	T02
T03	T01	T05	T06	T02	T04
T02	T06	T05	T03	T04	T01

Figura 17. Croquis experimental segunda fase de laboratorio

3.3.6.6 Modelo matemático

En la primera fase de laboratorio se aplicará el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + C_j + (BC)_{ij} + e_{ijk}$$

Dónde:

μ =Media poblacional

B_i =Efecto del i-ésimo biotipo de *Chlorella sp.*

C_j =Efecto de la j-ésima concentración de ácido indol 3-acético (AIA).

(BC) ij =Efecto de la interacción del i-ésimo biotipo de *Chlorella*. y la j-ésima concentración de ácido indol 3-acético (AIA).

e_{ij} =Error experimental

En la segunda fase de laboratorio se aplicará el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde:

μ =Media poblacional

B_i =Efecto del i-ésimo Tratamiento

e_{ij} =Error experimental

3.3.7 Análisis estadístico

El análisis de datos obtenidos en la investigación se realizará mediante el software estadístico Infostat.

3.3.8 Análisis funcional

Las variables evaluadas se calcularon mediante estadística descriptiva empleando (media, desviación estándar y coeficiente de variación). En la primera fase de laboratorio se empleó ANOVA (análisis de varianza) para modelos factoriales aplicando la prueba de Duncan para determinar la presencia de interacción entre Biotipos de *Chlorella* y dosis de ácido indol 3-acético.

Se realizó la prueba de Shapiro wilks para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para comprobar la homocedasticidad. Para determinar la relación entre las variables productivas con las cinéticas de crecimiento, componentes celulares y el pH se realizó un análisis de correlación de Pearson al 5%.

En la segunda fase experimental se procedió a realizar un análisis de homogeneidad de varianza para determinar el cumplimiento de los supuestos del ANOVA. Se realizaron análisis de varianza para determinar la presencia de diferencias significativas en las variables evaluadas en los diferentes tratamientos empleando un test de comparación múltiple LDS Fisher bajo un nivel de confianza de 95%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados Primera fase de investigación

4.1.1 Evaluación de Parámetros productivos (Densidad celular y Peso seco)

En la tabla 9 se muestra el análisis de varianza para densidad celular y peso seco, se apreció efectos significativos en la interacción biotipo x concentración de AIA ($F=44.65$; $p<0.0001$) y ($F=61,1$; $p<0.0001$) respectivamente.

El test de Duncan ($p > 0.05$) presentó diferencias significativas en la densidad celular y peso seco durante el último día de evaluación, destacándose la solución de trabajo de 30 mg L^{-1} AIA en *Chlorella* biotipo 1 ,generando una densidad celular de $(17.44 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1} \pm 0.28)$ y un peso seco de $(0.335 \text{ g L}^{-1} \pm 0.006)$, en *Chlorella* Biotipo 2 y 3 destacaron las soluciones de trabajo de 50 mg L^{-1} AIA y 30 mg L^{-1} AIA respectivamente con las cuales se obtuvieron densidades celulares y pesos secos de $(13.26 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1} \pm 0.23)$, $(0.245 \text{ g L}^{-1} \pm 0.006)$ y $(12.19 \times 10^6 \text{ células ml}^{-1} \pm 0.28)$, $(0.236 \text{ g L}^{-1} \pm 0.006)$.

Tabla 9

Promedio \pm error estándar de la densidad celular y peso seco obtenidos en el último día de evaluación (día 15)

Biotipo	[AIA]	DC (1×10^6 Células mL^{-1})	Peso seco (g L^{-1})
Biotipo 1	0	7.82 ± 0.69 fg	0.172 ± 0.011 de
	10	15.1 ± 0.41 b	0.273 ± 0.008 b
	30	17.44 ± 0.28 a	0.335 ± 0.006 a
	50	10.47 ± 0.48 e	0.195 ± 0.005 d

CONTINÚA



Biotipo 2	0	8.55 ± 0.43 fg	0.155 ± 0.006 ef
	10	11.08 ± 0.2 de	0.185 ± 0.005 d
	30	7.15 ± 0.16 g	0.128 ± 0.005 g
	50	13.26 ± 0.23 c	0.245 ± 0.006 c
Biotipo 3	0	10.39 ± 0.74 e	0.16 ± 0.011 e
	10	11.14 ± 0.82 de	0.194 ± 0.012 d
	30	12.19 ± 0.28 cd	0.236 ± 0.006 c
	50	8.87 ± 0.42 f	0.133 ± 0.006 fg
CV		7.43	6.62
Biotipo (A)		**	**
[AIA] (B)		**	**
A x B		**	**
p-valor (A x B)		<0.0001	<0.0001

*DC =Densidad celular, AIA=Concentración de Ácido indol 3-acético, CV=Coeficiente de variación, (A x B) = interacción (Biotipo x Concentración de AIA), **=diferencia significativa, ns=no significativo, Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Duncan $p > 0.05$)*

4.1.1.1 Curvas de desarrollo de la (Densidad celular y peso seco)

El desarrollo de la densidad celular (Células mL⁻¹) en la primera fase experimental se encuentra ilustrado en la figura 20. Las soluciones de trabajo en los tres biotipos de *Chlorella* se incorporaron en el séptimo día de evaluación durante la fase de aceleramiento de los cultivos. En *Chlorella* Biotipos 1 y 3 se puede apreciar un efecto positivo en la densidad celular al incorporar las soluciones de trabajo de AIA de 10 y 30 mg L⁻¹ superando la producción de los tratamientos testigos (AIA 0 mg L⁻¹) durante el último día de evaluación (Tabla 9, Figura 18), mientras que al incorporar la solución de trabajo de AIA 50 mg L⁻¹ se observó una reducción considerable del efecto. Al adicionar las soluciones de trabajo de 10 y 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 se pudo observar un incremento en la densidad celular en el último día de evaluación tomando como base al tratamiento testigo (AIA 0 mg L⁻¹).

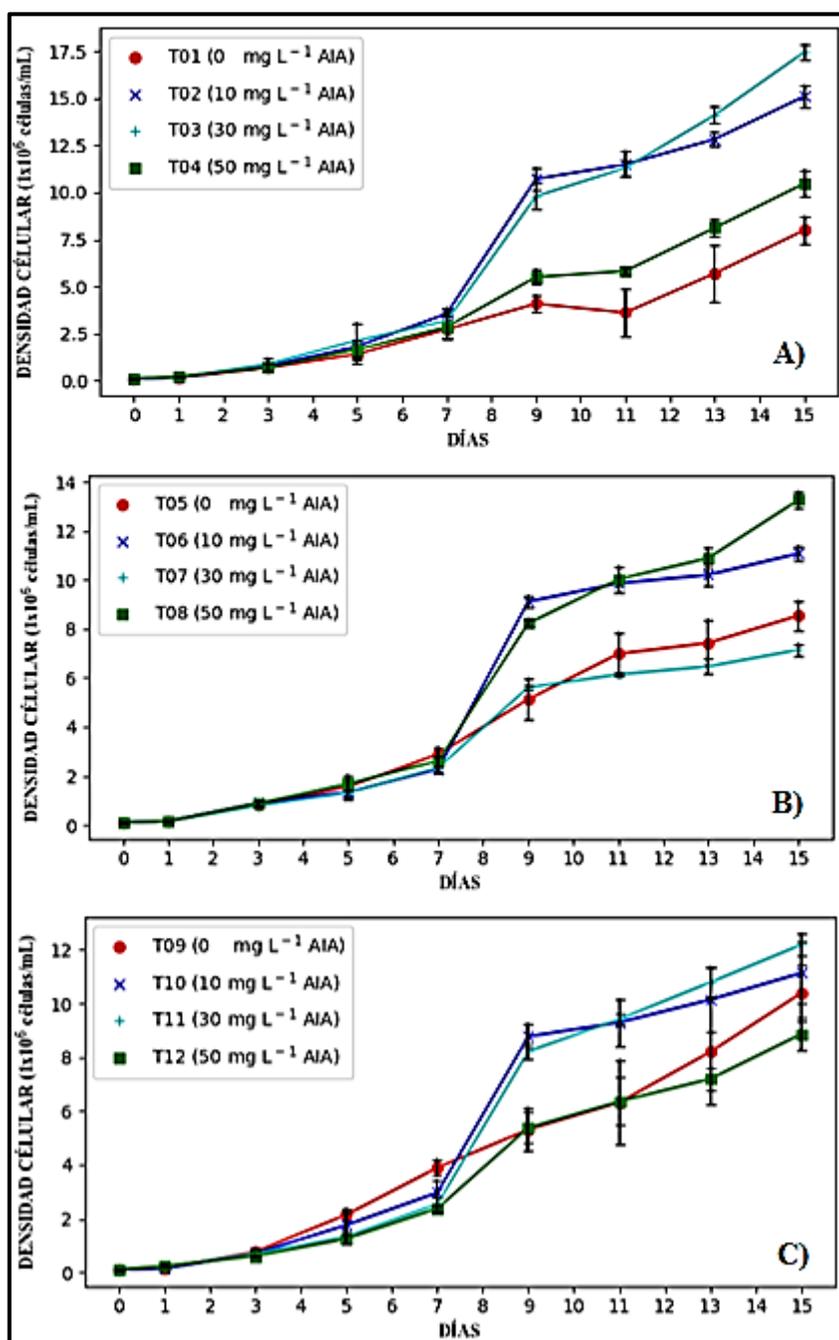


Figura 18. Promedio \pm Desviación estándar, de la Densidad celular (Células mL⁻¹) durante la primera fase experimental, A) *Chlorella* Biotipo 1, B) *Chlorella* Biotipo 2, C) *Chlorella* Biotipo 3.

Las curvas de desarrollo de peso seco (g L^{-1}) para los tratamientos evaluados se muestran en la figura 22. La biomasa seca obtenida bajo el efecto de las concentraciones de 10 y 30 mg L^{-1} de AIA en *Chlorella* Biotipo 1 y 3 mostró un desarrollo superior que en los tratamientos testigos (T01, T09) en el último día de evaluación evidenciado diferencias significativas con un $p > 0.05$ (Tabla 10, Figura 19).

En *Chlorella* Biotipo 2 las soluciones de trabajo de AIA de 10 y 50 mg L^{-1} generaron un efecto positivo en la obtención de biomasa seca (g L^{-1}), en el último día de evaluación (día 15) ($p > 0.05$), sin embargo, al incorporar la solución de trabajo de AIA de 30 mg L^{-1} la biomasa obtenida fue menor que en el tratamiento testigo correspondiente (T05) (Tabla 9, Figura 19).

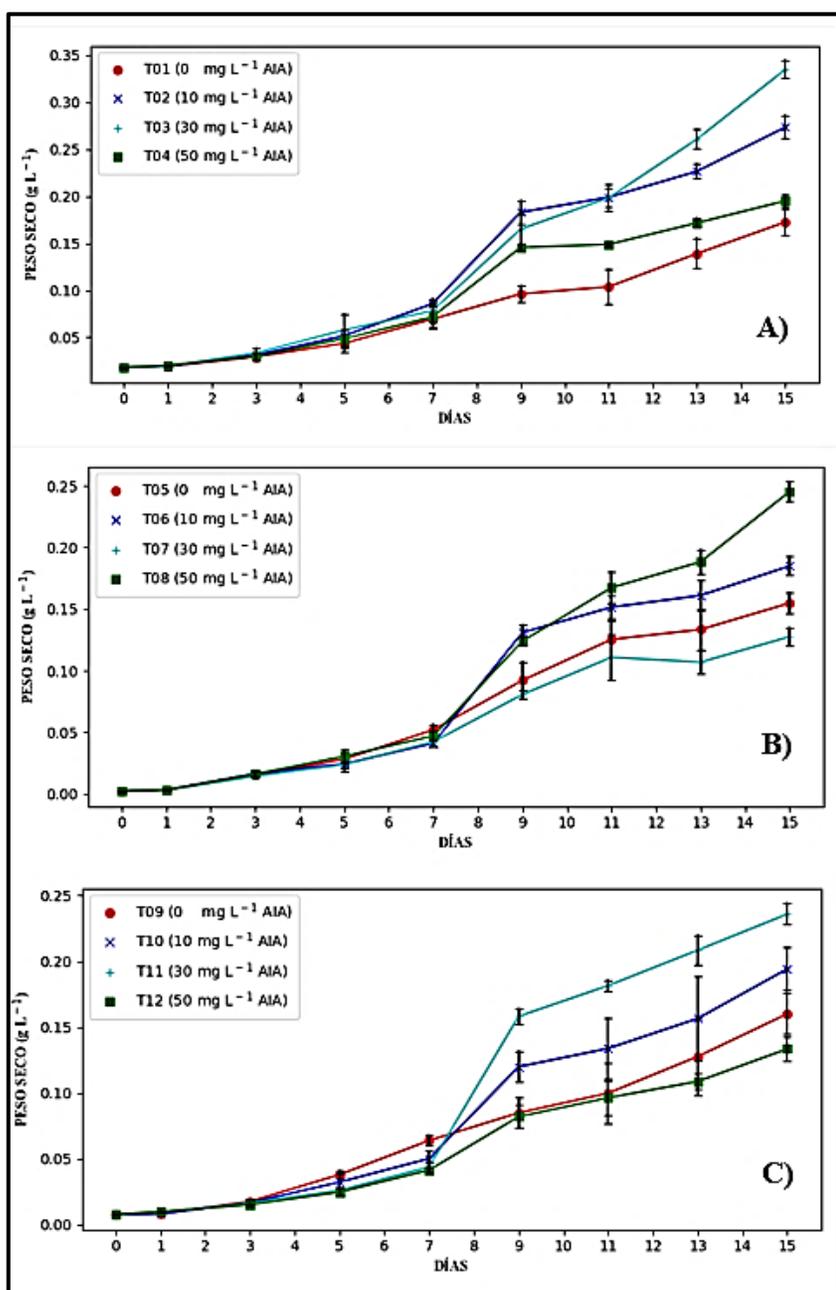


Figura 19. Promedio \pm Desviación estándar, del desarrollo del Peso seco (g L^{-1}) durante la primera fase experimental, A) *Chlorella* Biotipo 1, B) *Chlorella* Biotipo 2, C) *Chlorella* Biotipo 3

4.1.2 Evaluación de la cinética de crecimiento (Velocidad específica de crecimiento (μ) (1×10^6 Células día⁻¹) y tiempo de duplicación (Td) (Hora)

El análisis de varianza para las cinéticas de crecimiento μ y Td presentó efectos significativos en la interacción Biotipo x Concentración de AIA, con $F=10.67; p<0.0001$ y $F=7.53; p<0.0001$ respectivamente (Tabla 10). La Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación evidenciaron diferencias significativas, el tratamiento AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 1 registró la mayor μ con (0.22 ± 0.016) (1×10^6 Células día⁻¹) seguida de los tratamientos AIA 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 y AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 3 con una μ de $(0.22 \pm 0.016 \times 10^6$ Células día⁻¹) respectivamente (Tabla 11). En *Chlorella* Biotipo 1 y 2 los tratamientos AIA 30 mg L⁻¹ y AIA 50 mg L⁻¹ presentaron un tiempo de duplicación (Td) más rápido con (3.26 ± 0.24) y (3.41 ± 0.09) (Horas) respectivamente seguidos del tratamiento AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 3 con un Td de (3.26 ± 0.24) horas.

Tabla 10

Promedio \pm error estándar de la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td) obtenidos en la fase exponencial (día 7 al 15)

Biotipo	[AIA]	μ (1×10^6 Células día ⁻¹)	Td (Horas)
Biotipo 1	0	0.13 ± 0.008 e	5.27 ± 0.32 c
	10	0.18 ± 0.005 bc	3.85 ± 0.1 ab
	30	0.22 ± 0.016 a	3.26 ± 0.24 a
	50	0.16 ± 0.012 cd	4.27 ± 0.35 b
Biotipo 2	0	0.14 ± 0.01 e	5.17 ± 0.36 c
	10	0.2 ± 0.004 ab	3.52 ± 0.08 ab
	30	0.14 ± 0.008 de	5.01 ± 0.31 c
	50	0.2 ± 0.005 ab	3.41 ± 0.09 a

CONTINÚA



Biotipo 3	0	0.12 ± 0.006 e	5.7 ± 0.28 c
	10	0.17 ± 0.004 cd	4.19 ± 0.1 b
	30	0.2 ± 0.007 ab	3.54 ± 0.12 ab
	50	0.16 ± 0.005 cd	4.23 ± 0.15 b
CV		8.61	9.48
Biotipo (A)		Ns	Ns
[AIA] (B)		**	**
A x B		**	**
p-valor (A x B)		<0.0001	<0.0001

μ = Velocidad específica de crecimiento, Td= tiempo de duplicación, AIA= Concentración de Ácido indol 3-acético, CV=Coefficiente de variación, (A x B) = interacción (Biotipo x Concentración de AIA), **=diferencia significativa, ns=no significativo, Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Duncan $p > 0.05$)

4.1.3 Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos

El análisis de varianza para el contenido de clorofila α , Clorofila β , Clorofila total y carotenos presentó efectos significativo en la interacción biotipo x concentración de AIA, (F=179.82;p<0.0001); (F=79.69;p<0.0001); (F=254.71;p<0.0001) y (F=35.3;p<0.0001) respectivamente (Tabla 11).Se observaron diferencias significativas entre tratamientos al analizar el contenido de los pigmentos fotosintéticos empleando la prueba de Duncan ($p>0.05$).Se pudo observar mayor acumulación de clorofila en los tratamientos con inclusión de AIA 50 mg L⁻¹.

Se observaron diferencias significativas en la producción de carotenos ($p>0.05$), los tratamientos con inclusión de AIA incrementaron considerablemente el contenido de carotenos en los tres biotipos de *Chlorella* superando a los tratamientos testigos correspondientes (AIA 0 mg L⁻¹).

Tabla 11

Promedio ± error estándar del contenido de Clorofila α (mg g⁻¹), Clorofila β (mg g⁻¹), Clorofila total (mg g⁻¹), Carotenos (mg g⁻¹) obtenidos en el último día de evaluación (día 15)

Biotipo	[AIA]	Clorofila α (mg g⁻¹)	Clorofila β (mg g⁻¹)	Clorofila total (mg g⁻¹)	Carotenos (mg g⁻¹)
Biotipo 1	0	13,17 ± 0.04 g	5.19 ± 0.4 g	18.37 ± 0.38 hi	3.72 ± 0.16 g
	10	14,83 ± 0.26 f	8.4 ± 0.11 e	23.23 ± 0.15 g	6.23 ± 0.05 ab
	30	18,55 ± 0.01 ab	12.44 ± 0.17 c	30.99 ± 0.17 c	5.24 ± 0.04 c
	50	18,13 ± 0.34 bc	15.39 ± 0.17 a	33.52 ± 0.21 a	5.29 ± 0.18 c
Biotipo 2	0	13,28 ± 0.03 g	5.37 ± 0.38 fg	18.65 ± 0.35 h	4.05 ± 0.02 f
	10	18,28 ± 0.06 b	9.56 ± 0.13 d	27.84 ± 0.19 d	6.04 ± 0.04 b
	30	12,10 ± 0.13 h	5.66 ± 0.08 fg	17.76 ± 0.21 i	4.58 ± 0.03 e
	50	19,03 ± 0.21 a	13.26 ± 0.15 b	32.29 ± 0.27 b	6.31 ± 0.06 a
Biotipo 3	0	13,10 ± 0.06 g	5.91 ± 0.18 f	19 ± 0.24 h	4.11 ± 0.02 f
	10	16,38 ± 0.1 e	9.29 ± 0.17 d	25.67 ± 0.27 f	5.09 ± 0.05 c
	30	17,11 ± 0.23 d	9.6 ± 0.11 d	26.7 ± 0.25 e	4.85 ± 0.04 d
	50	17,78 ± 0.08 c	13.16 ± 0.11 b	30.94 ± 0.19 c	5.14 ± 0.1 c
CV		1.78	3.77	1.69	2.82
Biotipo (A)		**	**	**	**
[AIA] (B)		**	**	**	**
A x B		**	**	**	**
p-valor (A x B)		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

*AIA= Concentración de Ácido indol 3-acético, CV=Coeficiente de variación, (A x B) = interacción (Biotipo x Concentración de AIA), **=diferencia significativa, ns=no significativo, Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Duncan p > 0.05)*

4.1.4 Evaluación del contenido de proteínas y lípidos

El análisis de varianza para el contenido proteínas no presentó efectos significativos en la interacción biotipo x concentración de AIA ($F=0.74$; $p=0.6221$), mientras que el porcentaje de lípidos mostró efectos significativos en la interacción biotipo x concentración de AIA, ($F=35.3$; $p<0.0001$) (Tabla 12). El contenido proteínico obtenido no difirió significativamente ($p<0.05$) registrando valores entre 40,53 a 42,15 % siendo ligeramente superior en los tratamientos con inclusión de 50 mg L⁻¹ de AIA (Tabla 13). Al evaluar el contenido lipídico se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) destacándose las soluciones de trabajo de AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 1 y 3, en *Chlorella* Biotipo 2 destacó la solución de trabajo de AIA 50 mg L⁻¹.

Tabla 12

Promedio ± error estándar del contenido de proteínas y lípidos obtenidos en el último día de evaluación (día 15)

Biotipo	[AIA]	Proteína %	Lípidos %
Biotipo 1	0	40.83 ± 0.58 abc	9.14 ± 0.44 d
	10	41.06 ± 0.59 abc	18.19 ± 1.01 b
	30	41.39 ± 0.45 abc	24.19 ± 1.57 a
	50	42.15 ± 0.52 a	10.48 ± 0.67 d
Biotipo 2	0	40.17 ± 0.23 c	9.14 ± 1.08 d
	10	41.22 ± 0.24 abc	14.67 ± 0.67 c
	30	40.33 ± 0.29 bc	11.43 ± 0.44 d
	50	42.04 ± 0.28 a	19.52 ± 0.58 b
Biotipo 3	0	40.22 ± 0.24 bc	9.9 ± 0.69 d
	10	40.72 ± 0.29 bc	23.05 ± 1.22 a
	30	41.08 ± 0.38 abc	24.19 ± 1.84 a
	50	41.52 ± 0.38 ab	12.1 ± 0.67 cd

CONTINÚA



CV	1.78	3.77
Biotipo (A)	Ns	**
[AIA] (B)	**	**
A x B	Ns	**
p-valor (A x B)	0.6221	<0.0001

AIA= Concentración de Ácido indol 3-acético, CV=Coeficiente de variación, (A x B) = interacción (Biotipo x Concentración de AIA), **=diferencia significativa, ns=no significativo, Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Duncan $p > 0.05$)

4.1.5 Evaluación del potencial de hidrógeno pH

El potencial de hidrógeno durante la etapa experimental registró valores entre 7.3 a 8,7 siendo valores adecuados para la asimilación de nutrientes y para un correcto desarrollo del proceso de fotosíntesis en *Chlorella* (Figura 20) (Surindra & Verma, 2018).

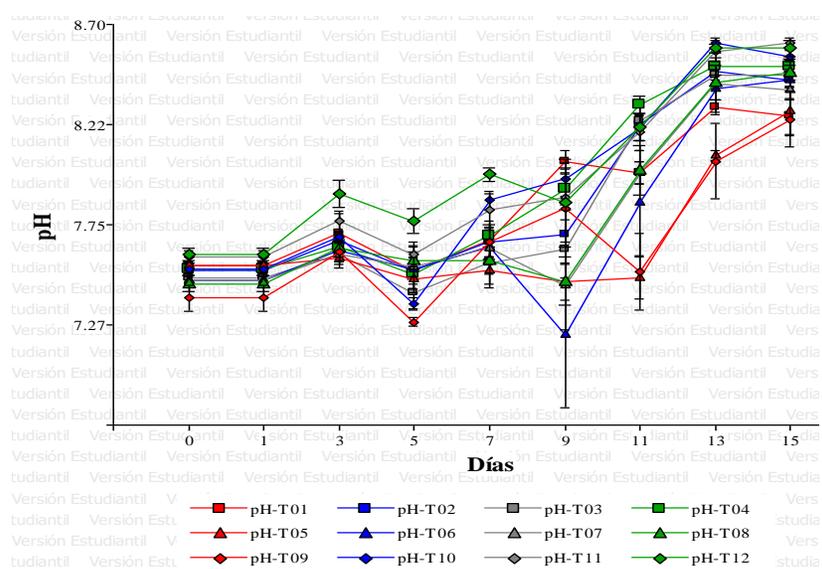


Figura 20. Variación de pH media \pm ee durante la primera etapa experimental.

4.1.6 Relación entre las variables productivas con las cinéticas de crecimiento, componentes celulares y pH

La densidad celular y el peso seco se correlacionaron positivamente con la velocidad de crecimiento específica (VCE) ($r = 0.7$; <0.0001) y con el contenido de lípidos ($r = 0.74$; <0.0001) y de manera negativa con el tiempo de duplicación (TD) ($r = -0.65$; <0.0001 , $r = -0.66$; <0.0001) (Tabla 13).

Tabla 13

Coefficiente de correlación de Pearson para las variables productivas

	PS	DC	VCE	TD	Pr	Lip	Cl α	Cl β	Cl t	Car	pH
PS	1	0.96**	0.7 **	-0.65	ns	0.74 **	ns	ns	ns	ns	ns
DC		1	0.7 **	-0.66	ns	0.74 **	ns	ns	ns	ns	ns

Ps=Peso seco, DC=Densidad celular, VCE=velocidad específica de crecimiento, TD=Tiempo de duplicación, Pr=Proteína, Lip=Lípidos, Cl α = Clorofila α , Cl β = Clorofila β , Cl t = Clorofila total, Car= Carotenos

4.2 Resultados Segunda fase de investigación

4.2.1 Evaluación de Parámetros productivos (Densidad celular y Peso seco)

En la segunda fase experimental se realizaron dos aplicaciones incorporando los mejores tratamientos de AIA definidos en la primera etapa experimental, de 30 mg L⁻¹ para *Chlorella* Biotipos 1 y 3 ,50 mg L⁻¹ para *Chlorella* Biotipo 2, las soluciones de trabajo se aplicaron en los días 7 (Fase de aceleramiento) y 14 (Fase exponencial).

El análisis de varianza para la densidad celular presentó efectos significativos en los días 13 y 21 (F=83,01; $p<0.0001$) y (F=21,07; $p<0.0001$) respectivamente. Al evaluar el peso seco obtenido en los días 13 y 21 se registraron efectos significativos (F=53,06; $p<0.0001$) y (F=22,21; $p<0.0001$) respectivamente.

La densidad celular y peso seco obtenidos en el día 13 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) destacándose como mejor tratamiento AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 1 seguido por los tratamientos AIA 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 y AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* biotipo 3 superando significativamente a los tratamientos testigos (AIA 0 mg L⁻¹). Durante aplicación de las soluciones de trabajo de AIA en la fase exponencial (día 14) se observó un incremento en los parámetros productivos destacándose como mejor tratamiento AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 1, seguido por el tratamiento AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 3, se pudo apreciar una disminución en los parámetros evaluados al aplicar la solución de trabajo de AIA 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 (Tabla 14).

Tabla 14

Promedio ± error estándar de la densidad celular y peso seco obtenidos en los días 13 y 21

Biotipo	[AIA]	Día 13		Día 21	
		DC (1*10 ⁶ Células/mL)	Peso seco (g/L)	DC (1*10 ⁶ Células/mL)	Peso seco (g/L)
Biotipo 1	0	5.62 ± 0.3 e	0.13 ± 0.006 c	11.33 ± 1.15 cd	0.24 ± 0.023 c
	30	13.17 ± 0.46 a	0.24 ± 0.01 a	18.57 ± 0.36 a	0.36 ± 0.01 a
Biotipo 2	0	5.847 ± 0.29 de	0.13 ± 0.005 c	9.81 ± 1.08 d	0.2 ± 0.021 cd
	50	11.26 ± 0.33 b	0.2 ± 0.008 b	12.33 ± 0.06 c	0.22 ± 0.003 cd
Biotipo 3	0	6.823 ± 0.14 d	0.11 ± 0.002 c	12.36 ± 0.26 c	0.19 ± 0.006 d
	30	10.13 ± 0.46 c	0.2 ± 0.009 b	15.8 ± 0.51 b	0.31 ± 0.01 b
CV		6.8	7.58	9.09	9.76
Tratamientos		**	**	**	**
p-valor		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

*DC =Densidad celular, AIA=Concentración de Ácido indol 3-acético, CV=Coficiente de variación, **=diferencia significativa, ns=no significativo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0.05$)*

4.2.1.1 Curva de desarrollo (Densidad celular y Peso seco) durante 21 días de evaluación

Las curvas de desarrollo de la densidad celular (Células mL⁻¹) y peso seco (g L⁻¹) en los tratamientos evaluados están ilustradas en las (Figuras 21 y 22). Durante la primera aplicación (día 7) se pudo observar un aceleramiento en el desarrollo celular y obtención de biomasa hasta el día 13 en los tratamientos con AIA, similar al efecto obtenido en la primera fase del estudio. En la segunda aplicación (día 14) se registró una disminución en la velocidad del desarrollo celular en los tratamientos con AIA. En el último día de evaluación la densidad celular obtenida en *Chlorella* Biotipo 1 y 3 incrementó considerablemente comparado con los tratamientos testigos correspondientes (T01, T05) en *Chlorella* biotipo 2 se registró una disminución en la densidad celular en el día 21 (Tabla 21).

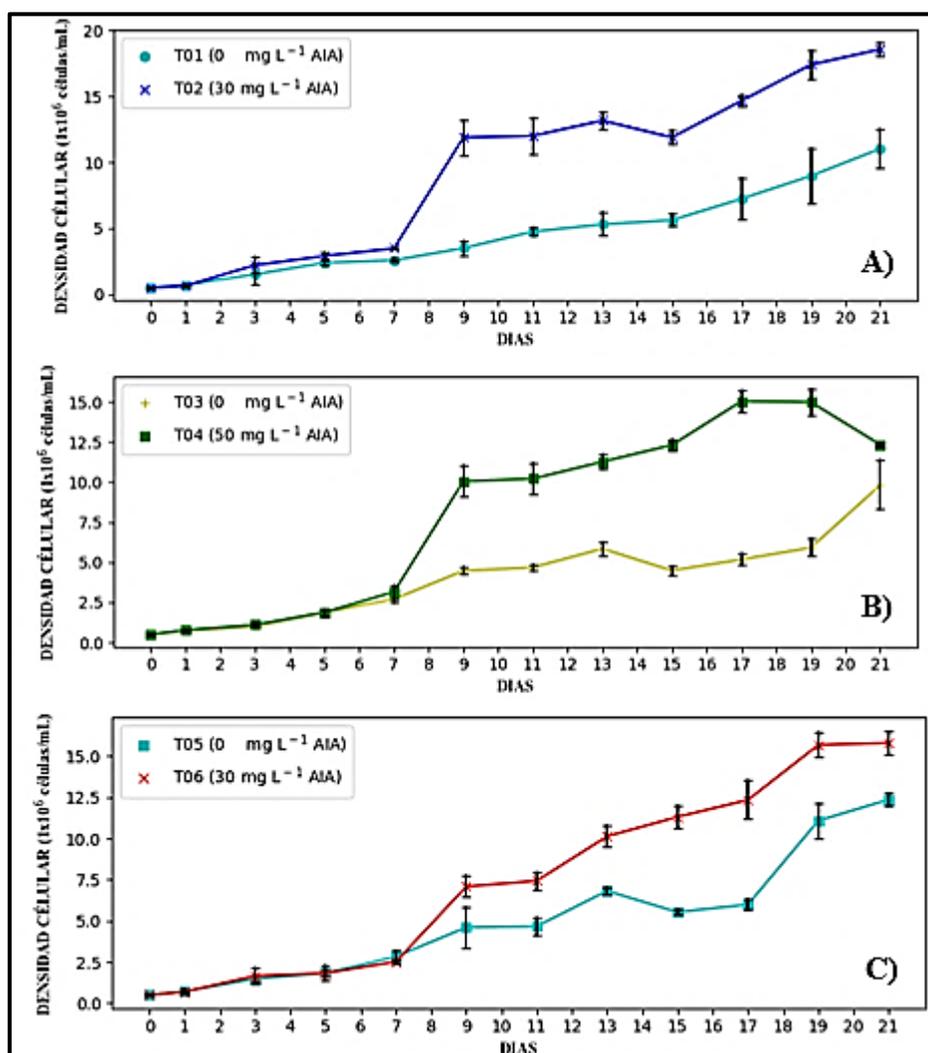


Figura 21. Promedio \pm Desviación estándar, de la Densidad celular (Células mL⁻¹) durante la segunda etapa experimental, A) *Chlorella* Biotipo 1, B) *Chlorella* Biotipo 2, C) *Chlorella* Biotipo 3.

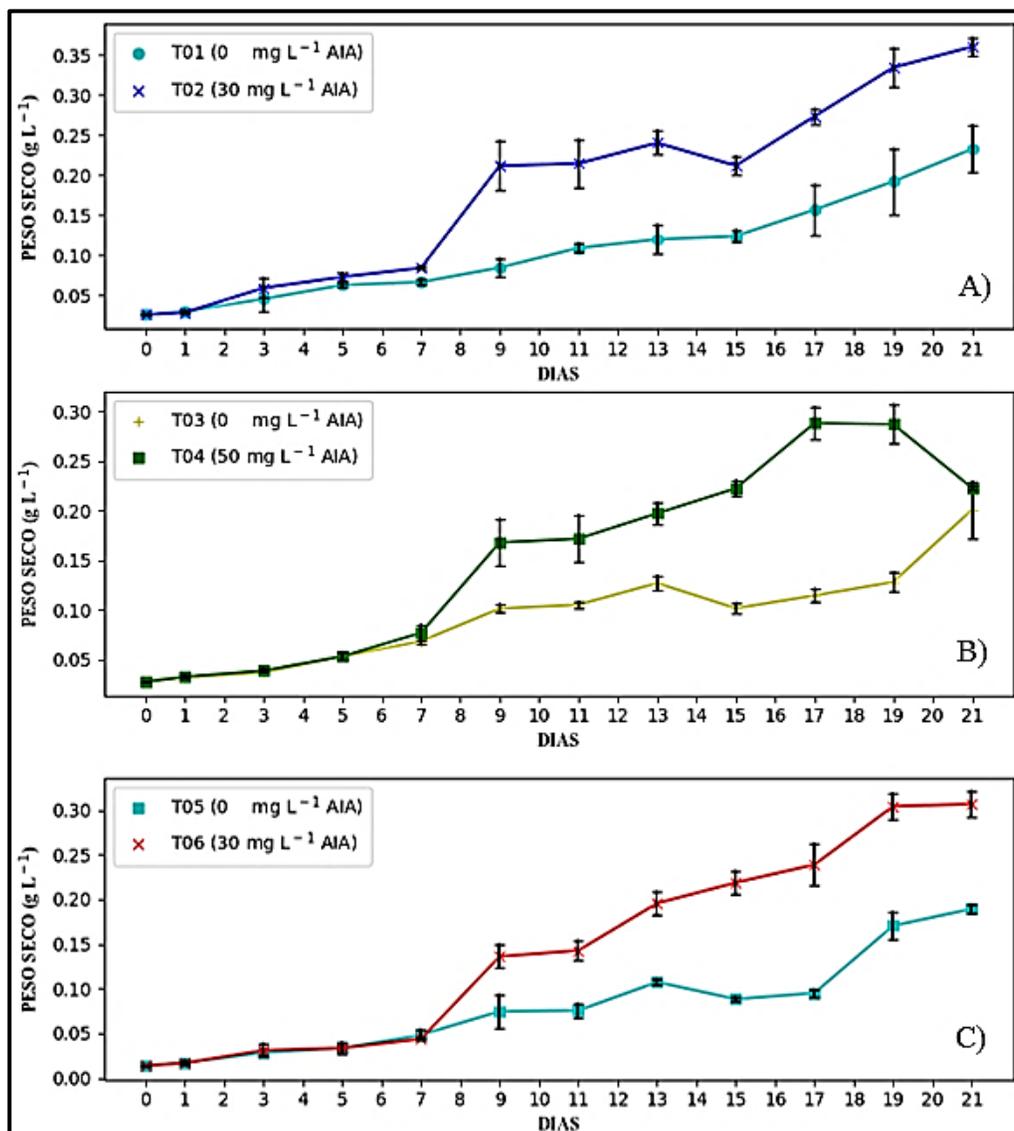


Figura 22. Promedio \pm Desviación estándar, del desarrollo del Peso seco ($g L^{-1}$) durante la segunda etapa experimental, A) *Chlorella* Biotipo 1, B) *Chlorella* Biotipo 2, C) *Chlorella* Biotipo 3.

4.2.2 Evaluación de las cinéticas de crecimiento Velocidad específica de crecimiento (μ) (Células día⁻¹) y tiempo de duplicación (Td) (Hora)

El análisis de varianza para la cinética de crecimiento μ presentó efectos significativos en los períodos del día 7 al 13 y día 15 al 19 de evaluación, ($F=34,01$; $p<0.0001$) y ($F=13,44$; $p<0.0001$) respectivamente (Tabla 15). Al analizar el tiempo de duplicación Td obtenido en los períodos del día 7 al 13 y día 15 al 19 se registraron efectos significativos, ($F=27,31$; $p<0.0001$) y ($F=15,83$; $p<0.0001$) respectivamente. En el período del día 7 al 13 se observaron diferencias significativas en μ y Td ($p<0.05$), destacándose los tratamientos AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 1, AIA 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 y AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 3 superando considerablemente a los tratamientos testigos (AIA 0 mg L⁻¹). En el período del día 15 al 19 se observaron diferencias significativas en μ y Td ($p<0.05$), en donde se pudo apreciar una disminución considerable en la μ y un incremento en el Td en los tratamientos con inclusión de AIA, mientras que en los tratamientos testigos se observó un incremento de μ y una disminución en el Td.

Tabla 15

Promedio ± error estándar de las cinéticas de crecimiento (μ y Td) en los periodos comprendidos entre el (día 7 al 13) y (día 15 al 19)

Biotipo	[AIA]	Día 7 al 13		Día 15 al 19	
		μ (1×10^6 Células día ⁻¹)	Td (Hora)	μ (1×10^6 Células día ⁻¹)	Td (Hora)
Biotipo 1	0	0.11 ± 0.007 c	6.21 ± 0.38 c	0.14 ± 0.021 a	5.19 ± 0.88 ab
	30	0.22 ± 0.005 a	3.13 ± 0.07 a	0.1 ± 0.007 b	7.37 ± 0.51 bc
Biotipo 2	0	0.13 ± 0.003 bc	5.38 ± 0.11 b	0.07 ± 0.006 bc	10.27 ± 0.96 c
	50	0.21 ± 0.013 a	3.26 ± 0.18 a	0.05 ± 0.006 c	14.56 ± 1.76 d
Biotipo 3	0	0.15 ± 0.015 b	4.76 ± 0.45 b	0.17 ± 0.02 a	4.13 ± 0.46 a
	30	0.23 ± 0.003 a	2.99 ± 0.04 a	0.08 ± 0.004 bc	8.5 ± 0.36 c
CV		8.79	10.47	21.75	19.69
Tratamientos		**	**	**	**
p-valor		<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0001

μ = Velocidad específica de crecimiento, Td= tiempo de duplicación, CV=Coeficiente de variación, AIA= Concentración de Ácido indol 3-acético, **=diferencia significativa, ns=no significativo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0.05$)

4.2.3 Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos (Día 21)

En la tabla 16 se muestra el análisis de varianza para el contenido clorofila α , Clorofila β , Clorofila total y carotenos, en donde se presentaron efectos significativos, ($F=42.61$; $p<0.0001$), ($F=14.06$; $p=0.0001$), ($F=36.03$; $p<0.0001$) y ($F=393.73$; $p=0.0001$) respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos al analizar el contenido de los pigmentos fotosintéticos ($p > 0.05$).

Al evaluar el contenido de clorofila total se observó un incremento notable en los tratamientos con inclusión de AIA, destacándose AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* biotipo 1 con un contenido de (30.46 ± 0.16 mg g⁻¹) seguido por los tratamientos AIA 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 3 y AIA 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2. Al analizar el contenido de carotenoides se observó un incremento considerable en los tratamientos con inclusión de AIA destacándose la solución de trabajo de (AIA 30 mg L⁻¹) en *Chlorella* Biotipo 1 y biotipo 3 y (AIA 50 mg L⁻¹) en *Chlorella* Biotipo 2 por lo cual se puede inferir que las auxinas poseen un efecto benéfico en el proceso fotosintético (Tabla 16).

Tabla 16

Promedio ± error estándar del contenido de Clorofila α (mg g⁻¹), Clorofila β (mg g⁻¹), Clorofila total (mg g⁻¹), Carotenos (mg g⁻¹) obtenidos en el último día de evaluación (día 21)

Biotipo	[AIA]	Clorofila α (mg g⁻¹)	Clorofila β (mg g⁻¹)	Clorofila total (mg g⁻¹)	Carotenos (mg g⁻¹)
Biotipo 1	0	13.68 ± 0.08 c	11.8 ± 0.21 a	25.48 ± 0.28 b	5.21 ± 0.03 d
	30	18.33 ± 0.04 a	12.13 ± 0.19 a	30.46 ± 0.16 a	6.56 ± 0.03 b
Biotipo 2	0	16.61 ± 0.1 b	8.91 ± 0.14 b	25.52 ± 0.24 b	5.26 ± 0.04 d
	50	16.73 ± 0.13 b	9.12 ± 0.18 b	25.85 ± 0.23 b	6.42 ± 0.03 c
Biotipo 3	0	16.48 ± 0.49 b	6.7 ± 1.26 c	23.19 ± 0.82 c	5.23 ± 0.06 d
	30	16.88 ± 0.22 b	9.24 ± 0.13 b	26.12 ± 0.24 b	6.88 ± 0.01 a
CV		2.44	9.69	2.63	1.14
Tratamientos		**	**	**	**
p-valor		<0.0001	0.0001	<0.0001	0.0001

*CV=Coeficiente de variación, AIA= Concentración de Ácido indol 3-acético, **=diferencia significativa, ns=no significativo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0.05$)*

4.2.4 Evaluación del contenido de proteínas y lípidos (día 21)

El análisis de varianza para el contenido proteínas y lípidos mostró efectos significativos ($F=3.7$; $p=0.0294$) y ($F=54.62$; $p<0.0001$) respectivamente (Tabla 17). El contenido proteínico obtenido difirió significativamente con un ($p<0.05$) registrando valores entre 42.65 a 44.88 % siendo ligeramente superior en los tratamientos testigos (AIA 0 mg).

Al evaluar el contenido lipídico se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) destacándose tratamientos con inclusión de AIA en la producción lipídica.

Tabla 17

Promedio \pm error estándar del contenido de proteínas y lípidos obtenidos en el último día de evaluación (día 21)

Media \pm ee			
Biotipo	[AIA]	Proteínas %	Lípidos %
Biotipo 1	0	44.44 \pm 0.47 ab	11.33 \pm 0.91 b
	30	44.28 \pm 0.39 ab	25.9 \pm 0.83 a
Biotipo 2	0	44.88 \pm 0.47 a	10.95 \pm 1.17 b
	50	42.65 \pm 0.62 c	23.33 \pm 1.33 a
Biotipo 3	0	43.08 \pm 0.39 bc	10.95 \pm 0.94 b
	30	43.03 \pm 0.48 bc	26.38 \pm 1.07 a
CV		1.89	10.09
Tratamientos		**	**
p-valor		0.0294	<0.0001

*CV=Coeficiente de variación, AIA=Concentración de Ácido indol 3-acético, **=diferencia significativa, ns=no significativo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0.05$)*

4.2.5 Evaluación del potencial de hidrógeno pH

El potencial de hidrógeno pH presentó efectos significativos en los días 13 y 21 ($F=48.64$; $p<0.0001$) y ($F=4.07$; $p=0.0216$) respectivamente (Tabla 18).

Al analizar el pH en el día 13 se observó un incremento considerable en los tratamientos con inclusión de AIA (Tabla 18, Figura 23). En el día 21 se observó el mismo comportamiento en donde destacaron nuevamente los tratamientos con inclusión de AIA (Figura 23).

Tabla 18

Promedio \pm error estándar pH obtenidos en los días 13 y 21

Biotipo	[AIA]	pH día 13		pH día 21	
Biotipo 1	0	8.09 \pm 0.02	c	8.5 \pm 0.09	bc
	30	8.47 \pm 0.03	a	8.71 \pm 0.03	a
Biotipo 2	0	8.23 \pm 0.02	b	8.57 \pm 0.03	abc
	50	8.47 \pm 0.02	a	8.63 \pm 0.06	ab
Biotipo 3	0	8.23 \pm 0.02	b	8.44 \pm 0.03	c
	30	8.43 \pm 0.02	a	8.64 \pm 0.01	ab
CV		1.89		10.09	
Tratamientos		**		**	
p-valor		<0.0001		0.0216	

CV=Coeficiente de variación, AIA=Concentración de Ácido indol 3-acético, **=diferencia significativa, ns=no significativo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher $p > 0.05$)

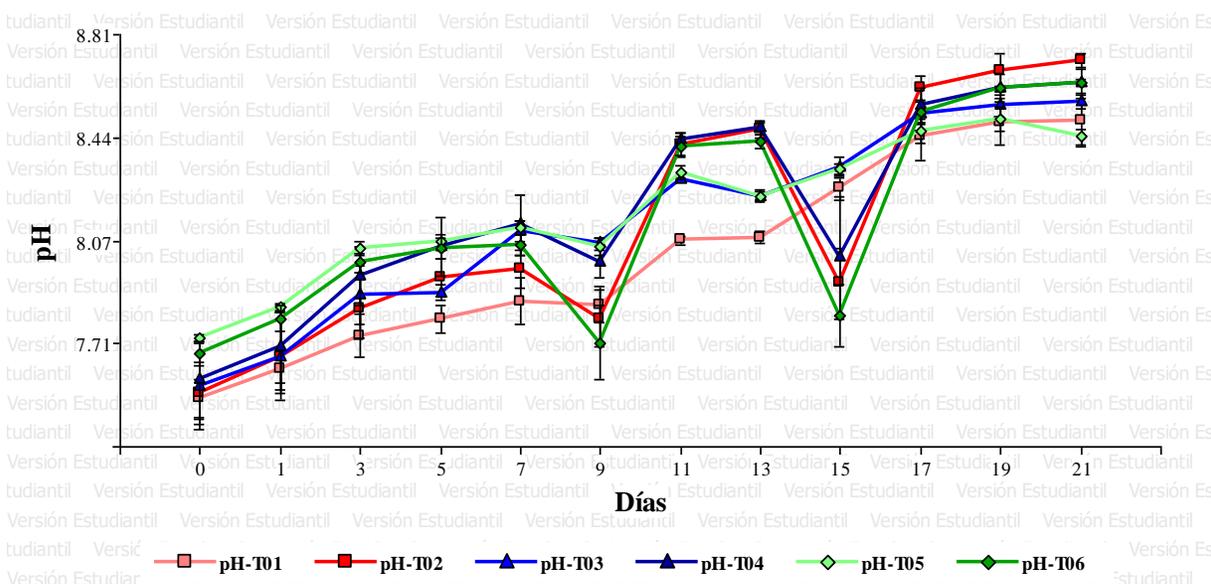


Figura 23. Variación de pH media \pm ee, durante la segunda etapa experimental.

4.3 Discusión

4.3.1 Evaluación de Parámetros productivos Densidad celular y Peso seco

En la presente investigación se determinó que el uso del AIA en la etapa de aceleramiento en *Chlorella* actuó como un estimulante bioquímico eficiente en la producción de biomasa y densidad celular obteniendo resultados favorables con las soluciones de trabajo de 30 mg L⁻¹ AIA en *Chlorella* Biotipos 1 y 3. Con 50 mg L⁻¹ AIA se logró mejores resultados con *Chlorella* Biotipo 2. Piotrowska y Bajguz (2014), mencionan que el incremento de biomasa está dado por la estimulación de enzimas antioxidantes las cuales actúan sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el H₂O₂ regulando sus niveles, lo cual induce a una división celular óptima. En el estudio realizado por Stirk, et al. (2014), en *Chlorella minutissima* se ha determinado que existe una vía dependiente de triptófano (TRP) precursora de antranilato (ANT) la cual produce AIA. Los resultados obtenidos fueron similares al estudio realizado por Liu, et al. (2016) en donde se evaluaron diferentes tipos de auxinas y varias concentraciones en la productividad de *Chlorella pyrenoidosa*. Al analizar el efecto producido por el ácido indol 3-acético AIA se determinó que la solución de trabajo de 40 mg L⁻¹ AIA generó mayor desarrollo celular produciendo mayor acumulación de biomasa con 0.234 g L⁻¹, mientras que al incrementar la concentración 60 mg L⁻¹ AIA se observó una reducción en el efecto (0.175 g L⁻¹). En el estudio realizado por Ozioko et al. (2015), se determinó que al implementar las soluciones de trabajo AIA de 10 y 15 mg L⁻¹ se obtuvo un efecto positivo en la densidad celular y peso seco.

De acuerdo al estudio elaborado por Udayan y Arumugam (2017), en *Nannochloropsis oceanica* la concentración de trabajo de 10 mg L⁻¹ de AIA generó mayor densidad celular y peso seco con 579.5 x 10⁶ células mL⁻¹ y 543.75 mg L⁻¹ respectivamente, observándose una disminución del efecto al incrementar la concentración del AIA.

En estudios realizados con *Chlorella sorokiniana* se determinó que la aplicación de AIA en diferentes concentraciones (0 a 50 mg L⁻¹) produjo un incremento significativo en la obtención de biomasa al aplicar la solución de 20 mg L⁻¹ seguido por las concentraciones de 10 y 5 mg L⁻¹ además se determinó que la aplicación de AIA contribuyo en la eficiencia para absorción de nutrientes mejorando el desarrollo celular , en dicho estudio se observó que al aumentar la concentración de AIA el desarrollo celular se vio drásticamente reducido.

Durante la segunda fase experimental las soluciones de trabajo se aplicaron en la etapa exponencial en donde se pudo observar una disminución en la velocidad de desarrollo celular y obtención de biomasa. Los resultados obtenidos se asemejan al comportamiento registrado en el estudio de Jusoh et al. (2015), en donde se aplicó 100 µM AIA en el cultivo de *Chlorella vulgaris* durante el término de la fase exponencial, registrando un desarrollo celular reducido al implementar la fitohormona, este efecto se sugiere que puede deberse a que en esta etapa el desarrollo celular está casi completo debido a que el cultivo ha consumido la mayor parte de los nutrientes necesarios para su desarrollo.

4.3.2 Evaluación de las cinéticas de crecimiento velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td)

En el presente estudio se observó que la aplicación del AIA incrementó la velocidad específica de crecimiento μ y redujo el tiempo de duplicación Td durante la aplicación del AIA en la etapa de aceleración de los cultivos, estos resultados se apreciaron con mayor claridad al aplicar las soluciones de trabajo de 30 mg L⁻¹ AIA en *Chlorella* Biotipos 1 y 3 y 50 mg L⁻¹ AIA en *Chlorella* Biotipo 2. Durante la segunda etapa experimental se aplicaron las soluciones de trabajo en la etapa exponencial del cultivo registrando una disminución de la μ y Td. En el estudio realizado por Jusoh et al. (2015), en donde se analizó el efecto del ácido indol 3-acético AIA en *Chlorella pyrenoidosa*

se determinó que la solución de trabajo que generó un efecto superior en la obtención de biomasa 40 mg L^{-1} AIA produjo mayor velocidad específica de crecimiento μ mientras que el tratamiento de 60 mg L^{-1} AIA redujo la obtención de biomasa disminuyendo la variable μ . En el estudio realizado por (Yu et al. 2017) en *Chlorella sorokiniana* se observó un comportamiento similar, en donde la solución de trabajo de AIA de 20 mg L^{-1} generó mayor producción de biomasa celular incrementando la μ en un 33.42% comparado con el control (0 mg L^{-1}) que obtuvo un desarrollo celular reducido por lo cual sugieren que el AIA mejora la asimilación de nutrientes debido a la estimulación en la velocidad de desarrollo celular.

4.3.3 Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos

En el presente estudio se observó que la aplicación de las soluciones de trabajo con AIA incrementó considerablemente el contenido de clorofila. En *Chlorella* Biotipos 1 y 3 se observó altos contenidos de clorofila en los tratamientos que obtuvieron un desarrollo celular menor (T04, T12), por lo cual se puede observar que no hay una relación directa entre la biomasa producida y el contenido de clorofila. Los resultados obtenidos coinciden con el estudio de et al. (2016), en donde los tratamientos que generaron menor cantidad de biomasa IPA 60 mg L^{-1} generaron altos contenidos de clorofila (2.391 mg L^{-1}) al igual que los tratamientos que produjeron altos contenidos de biomasa IPA 40 mg L^{-1} (3.156 mg L^{-1}) por lo cual Liu et al. (2016), sugiere que la aplicación de auxinas tiene un efecto beneficioso en el mecanismo fotosintético. En *Chlorella* Biotipo 2 se pudo apreciar una relación directa entre la biomasa producida y el contenido de clorofila total siendo superior en el tratamiento T08 (50 mg L^{-1} AIA) con $32.29 \pm 0.27 \text{ mg g}^{-1}$. En el estudio realizado por Ozioko et al. (2015), al evaluar diferentes tipos de Auxinas se observó una producción alta de clorofila relacionada directamente con el incremento de biomasa, siendo inferior en los

tratamientos que presentaron menor desarrollo celular, el tratamiento de AIA 15 mg L⁻¹ destacó en la producción de biomasa y clorofila generando 50.94 mg g⁻¹ de clorofila total.

Durante la segunda etapa experimental al aplicar las soluciones de trabajo durante la etapa exponencial se observó un comportamiento similar en donde las soluciones de trabajo con AIA generaron mayor acumulación de clorofila total.

Los carotenos son pigmentos fotosintéticos que intervienen en la captación de luz, en la foto protección y eliminación del exceso de energía lumínica de las células y tienen propiedades anti oxidativas que pueden ser aplicadas en la elaboración de alimentos como suplementos alimenticios para animales y humanos Markou y Nerantzis (2013). La aplicación de AIA en los tres biotipos de *Chlorella* reportó un incremento en el contenido de carotenos durante las dos fases de estudio superando considerablemente a los tratamientos testigos. En el estudio realizado por Piotrowska y Bajguz (2014), al evaluar diferentes tipos de auxinas se pudo apreciar que el AIA a 0.1 μM en *Chlorella vulgaris* obtuvo mayor acumulación de carotenos. Se ha reportado que en *Chlorella* sp la implementación de AIA induce la expresión de genes promotores de la carotenogénesis implicada en la acumulación de carotenos, en dicho estudio se observó que la aplicación de 5 μmol/L (0.87 mg L⁻¹) y 100 μmol/L (17.52 mg L⁻¹) de AIA generó 2.87 ± 0.13 y 2.71 ± 0.01 mg g⁻¹ comparados con un testigo con (1.11 ± 0.16 mg g⁻¹) Alsenani et al. (2019).

4.3.4 Evaluación del contenido de proteínas y lípidos

En las dos etapas experimentales realizadas en el presente estudio, se observó que las soluciones de trabajo de AIA no generaron un incremento significativo en el contenido proteínico, sin embargo, durante la primera fase experimental se observó un comportamiento peculiar en *Chlorella* Biotipos 1 y 3 en donde los tratamientos con 50 mg L⁻¹ (T04, T12) y que generaron menor desarrollo, celular obtuvieron mayor contenido proteínico. Esto se debe a que mientras más rápido

es el desarrollo celular, las células tienden a acumular más carbohidratos a diferencia de los cultivos con un desarrollo celular más lento, los cuales acumulan más proteína Markou y Nerantzis, (2013). Este efecto se puede apreciar con mayor claridad durante la segunda etapa experimental en donde los tratamientos testigos presentaron mayor contenido proteínico que los tratamientos con inclusión de AIA. En el estudio realizado por Ozioko et al. (2015), se reporta un comportamiento similar al presente estudio en donde, las soluciones de trabajo de AIA aplicadas no generaron diferencias significativas en el contenido proteínico obteniendo valores entre 43.38 a 46.64 %.

En las dos fases experimentales se aplicaron las soluciones de trabajo durante la etapa de aceleración de los cultivos observándose mayor acumulación de lípidos en los tratamientos que produjeron mayor biomasa, estos resultados son similares a los datos obtenidos por Liu et al. (2016), en donde la aplicación de diferentes concentraciones de AIA en *Chlorella pyrenoidosa* en la etapa de adaptación generó cambios en el componente lipídico, siendo superior en los tratamientos que generaron mayor contenido de biomasa obteniendo valores entre 9.86 a 11.23 %. Los resultados obtenidos por Udayan & Arumugam, (2017), al aplicar varias concentraciones de AIA en *Nannochloropsis* oceánica generaron un efecto similar al presente estudio en donde las concentraciones de AIA, estimularon la producción de lípidos superando considerablemente al tratamiento testigo. La aplicación de AIA desde 0 a 20 mg L⁻¹ en *Chlorella sorokiniana* registro un incremento del contenido lipídico obteniendo un contenido de 55.76% mediante en el tratamiento de 20 mg L⁻¹ que genero mayor producción de biomasa Yu et al. (2017).

Durante la segunda etapa experimental se colocó una segunda dosis de AIA en la etapa exponencial de los cultivos, efecto que produjo mayor acumulación de lípidos en los tres biotipos de *Chlorella*, estos resultados se asemejan a los datos obtenidos en el estudio realizado por Jusoh et al. (2015), en donde se reportó que al aplicar una solución de AIA de 100 µM en el cultivo de

Chlorella vulgaris durante la etapa de des aceleramiento del cultivo, se incrementó entre a un 39% el contenido lipídico debido a la activación de genes como el omega 3-ácido graso desaturasa (ω -3 FAD) que interviene en los mecanismos de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos en microalgas.

4.3.5 Evaluación del potencial de hidrógeno pH

En el presente estudio se observó una disminución del pH después la aplicación de las soluciones de trabajo, seguido por un incremento y estabilización del parámetro. Durante la segunda etapa experimental las soluciones de trabajo se aplicaron en los días 7 y 14 con lo cual se pudo apreciar una disminución marcada después de la aplicación de las soluciones de trabajo durante los días 9 y 15 (Figura 27) seguido de una estabilización entre 8,6 a 8,7.

En el estudio realizado por Yu et al. (2017), se observó que la aplicación de AIA produjo una reducción del pH, seguida de una estabilización del pH en un valor de 9. Yu et al. (2017), sugieren que la disminución del pH está dada por un incremento de la permeabilidad de las células generado por el AIA, efecto que activa enzimas de polisacáridos que generan rompiendo los enlaces químicos entre glucosa y microfibrillas de celulosa, lo cual promueve la expulsión de protones de H^+ del interior de las células al exterior, mecanismo que produce reducción del pH.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El uso del ácido indol 3-acético estimuló la obtención de la biomasa seca en los tres biotipos de *Chlorella* evaluados, favoreciendo la asimilación de nutrientes del medio de cultivo.
- El AIA en la etapa de aceleración de los cultivos actuó como un potente estimulante en la división celular lo cual generó mayor obtención de biomasa, al implementar la dosis 50 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipo 2 y 30 mg L⁻¹ en *Chlorella* Biotipos 1 y 3.
- La aplicación de los mejores tratamientos de AIA incrementaron la biomasa seca producida en los tres biotipos de *Chlorella*, registrando un efecto similar a la primera fase de estudio, en los componentes celulares se observó un incremento en el contenido de lípidos, pigmentos fotosintéticos, pero no en el contenido proteínico.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar el AIA en el cultivo de *Chlorella* para estimular el desarrollo celular y la producción de biomasa.
- Es importante realizar un estudio bromatológico del perfil lipídico de la biomasa de *Chlorella* producida con AIA para evaluar su posible aplicación en la formulación de suplementos alimenticios en dietas balanceadas de peces u otras especies de interés pecuario.
- Analizar la composición de carotenoides de la biomasa de *Chlorella* producida con AIA para evaluar su rol como agente terapéutico en el control de enfermedades microbianas en especies acuícolas.
- Para incrementar la producción de biomasa en *Chlorella* se recomienda evaluar la interacción de AIA y citoquininas,
- Se recomienda aplicar el AIA en especies de microalgas como *Haematococcus pluvialis* para promover la obtención de biomasa y carotenos (astaxantina)

5.3 Bibliografía

- Antoun, H., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum* spp. in promoting growth of *chlorella vulgaris*. *Phycological Society of America*, 44, 938–947.
- Arce , M. (2009). Normal climática y distribución de la precipitación de la hacienda El Prado-IASA. *Serie Zoológica*, 4(5), 126-128.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. La Paz, Baja California, México: Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Asuthkar, M., Gunti, Y., Rao, R., & Yadavalli, R. (2016). Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 1000-1005.
- Batista, A., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 23-72.
- Cerón, M. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanod y animales. *CEA05*, 83-101.
- Charlotte, F., François, C., & Travers. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine drugs*, 14(159), 1-27.
- Espinoza , F. M. (2017). Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados? *Ciencia*, 68(2), 2-5.
- Galal, A. A., Reda, R. M., & Abdel-Rahman Mohamed, A. (2018). Influences of *Chlorella vulgaris* dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of penoxsulam herbicide. *Fish and Shellfish Immunology*, 77, 445-456.

- Ganuzá, E., Sellers, C., Bennett, B., Lyons, E., & Carney, L. (2016). A Novel Treatment Protects *Chlorella* at Commercial Scale from the Predatory Bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Frontiers in microbiology*(7).
- García, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Sevilla: Universidad de Sevilla Consejo de investigaciones científicas(España):Tesis Doctoral .
- González, A. (2015). ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. *Cajamar ADN Agro*(11), 1-11.
- Guaman Burneo, M. C., & González Romero, N. P. (2016). *Biodiversidad de los principales géneros de microalgas y cianobacterias encontradas en los sistemas lacustres de áreas protegidas de los andes y amazonía del Ecuador*. Quito: Corporación para la investigación energética.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2020). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. Recuperado el 05 de 01 de 2020, de <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6964>
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2020). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. Recuperado el 05 de 01 de 2020, de <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6964>
- Halima, N. (2017). Why is it important to use algae in aquaculture? *Biochem Biotech*, 1(1), 11-13.
- Helm, M. (2004). *Hatchery culture of bivalves*. Roma: Food and agriculture organization of the united nations.
- Hubert, P., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A New Insight into Cell Walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25, 333-371.
- Janssen, M. G. (2002). *Cultivation of microalgae:effect of light/dark cycles on biomass yield*. Wageningen: Wageningen University.
- Jusoh, M., Hong, S., Seng, T., Aziz, A., & San, T. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content, fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. *Phytochemistry*, 65–71.
- Lissarrague, J., Baeza, P., & Sánchez, P. (2010). La Fotosíntesis. Universidad Politécnica de Madrid. Obtenido de <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos/Fotosintesisvid.pdf>

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

- Ren, X., Zhao, X., Turcotte, F., Deschênes, J., Tremblay, R., & Jolicoeur, M. (2017). Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 26.
- Richmond, A. (2004). *Microalgal culture biotechnology and applied phycology*. Iowa: Blackwell Science Ltd.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. España: Universidad Politecnica de Valencia.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., & Vaca, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265–278.
- Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper.
- Stirk, W., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., . . . van Staden, J. (2014). Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, *79*, 66-76.
- Strickland, J., & Parsons, T. (1972). *A practical Handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fisheries research board of Canada .
- Surindra, S., & Verma, R. (2018). Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. *Process Safety and Environmental Protection*, *113*, 141–148.
- Tejeda, L., Henao, D., Alvear, M., & Castillo, C. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*, *24*(39), 43-54.
- Tipan, M. (2017). Uso de microalgas endémicas del Ecuador (*Chlorella* sp. Biotipo 3) en la bioacumulación de insecticidas a nivel de laboratorio. Universidad de las fuerzas armadas (ESPE) Tesis de grado.
- Udayan, A., & Arumugam, M. (2017). Selective Enrichment of Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in *N. oceanica* CASA CC201 by Natural Auxin Supplementation. *Bioresource Technology*.

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