



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA MICROALGA *Scenedesmus sp*
DE LA LAGUNA DE LIMONCOCHA PARA APLICACIÓN EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA”**

Realizado por:
LAURA CARINA FERNANDEZ ALMACHE

Director del proyecto:
Dr. PABLO CASTILLEJO PhD.

Como requisito para la obtención del título de:
MAGISTER EN GESTIÓN AMBIENTAL

Quito, abril de 2018

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, LAURA CARINA FERNANDEZ ALMACHE, con cédula de identidad # 1720118056, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Laura Carina Fernández Almache

C.C.: 1720118056

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

El presente trabajo de investigación titulado:

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA MICROALGA *Scenedesmus sp*
DE LA LAGUNA DE LIMONCOCHA PARA APLICACIÓN EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA”**

Realizado por:

LAURA CARINA FERNANDEZ ALMACHE

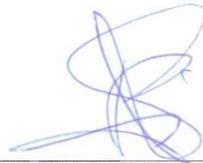
Como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN GESTIÓN AMBIENTAL

Ha sido dirigido por el profesor

PABLO CASTILLEJO

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Dr. Pablo Castillejo PhD.

DIRECTOR

Los Profesores Informantes:

JEFFERSON RUBIO

IVONNE CARRILLO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador.



Jefferson Rubio



Emma Carrillo

Quito, abril de 2018

DEDICATORIA

Dedicado a mis dos grandes amores: Laura Michelle y Sarah Micaela, mi inspiración y motor para ser mejor cada día.

Laura Fernández A.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su infinito amor.

A mis padres por el apoyo incondicional, el amor y la motivación para cada día ser mejor.

A todos mis maestros y amigos por hacer del entorno educativo un lugar agradable para trabajar y aprender.

A mi director de tesis, Pablo, por motivarme a aprender mucho más y realizar un trabajo bien hecho.

A mis revisores Jefferson e Ivonne, por ser la ayuda idónea en el momento indicado.

Al Dr. José Miguel Sánchez, por ser un mentor y amigo en el ámbito laboral, por su cariño y factibilidad para cumplir mi meta.

Laura Fernández A.

25/4/18 7:36:14 a.36.p.36.

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA MICROALGA *Scenedesmus sp*
DE LA LAGUNA DE LIMONCOCHA PARA APLICACIÓN EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA”**

“Isolation and identification of microalgae *scenedesmus sp* from the lagoon of
Limoncocha for application in the food industry”

Laura Fernández¹ & Pablo Castillejo²

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito,
Ecuador. Email: lauris.fernandez@hotmail.com

²Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito,
Ecuador. Email: pablo.castillejo@uisek.edu.ec

- Autor de correspondencia: PhD. Pablo Castillejo, pablo.castillejo@uisek.edu.ec

Titulo corto (Running title): Aislamiento de microalgas

Resumen

Debido a las características geográficas y de clima, el Ecuador es considerado un país megadiverso. En la laguna de Limoncocha se ha podido identificar la proliferación de varias especies microalgales, el estudio de estas especies nos permite investigar sobre la biodiversidad y las aplicaciones biotecnológicas que se puedan dar a estas especies.

Esta investigación constituye parte del proyecto que tiene por objeto identificar a las microalgas presentes en la laguna de Limoncocha.

Se partió de muestras de un consorcio de cianobacterias y microalgas obtenido de la laguna de Limoncocha. Considerando las condiciones óptimas de luz y temperatura para su crecimiento se inoculó en medio sólido Bristol con la técnica de estriado, trascurrido 10 días de crecimiento se tomó una muestra algal y se realizó 7 diluciones seriadas que se inocularon en medio sólido Bristol, observando el cultivo axénico en la dilución 10^5 y 10^6 .

Se realizó una identificación microscópica utilizando claves dicotómicas para identificación de microalgas y cianobacterias con un laboratorio externo, con lo que se confirmó que el cultivo es axénico y corresponde a la microalga *Scenedesmus sp.*

Luego, se realizó cinética de crecimiento en medio de cultivo Bristol y BG11, obteniendo como resultados un mayor crecimiento celular en el medio de cultivo Bristol y con fase exponencial en los días 6, 7, 8 y 9, lo que resultó en una producción de biomasa 0.495g/L. Por último, se realizó análisis de contenido proteico de las biomásas obtenidas en medio de cultivo Bristol y BG11 arrojando resultados 38,13% y 34,58% respectivamente.

Palabras clave

Microalga, Limoncocha, aislar, biomasa, proteico

Abstract

Due to geographic and climate characteristics, Ecuador is considered a mega-diverse country. In the Limoncocha lagoon it has been possible to identify the proliferation of several microalgal species, the study of these species allows us to investigate the biodiversity and the biotechnological applications that can be given to these species.

This research is part of the project that aims to identify the microalgae present in the Limoncocha lagoon.

We started with samples from a consortium of cyanobacteria and microalgae obtained from the Limoncocha lagoon. Considering the optimum conditions of light and temperature for its growth, it was inoculated in Bristol solid medium with the striate technique, after 10 days of growth an algal sample was taken and 7 serial dilutions were made and inoculated on Bristol solid medium, observing the culture axenic in the dilution 10^5 and 10^6 .

A microscopic identification was made using dichotomous keys for identification of microalgae and cyanobacteria with an external laboratory, which confirmed that the culture is axenic and corresponds to the microalga *Scenedesmus* sp.

Then, growth kinetics was performed in Bristol and BG11 culture media, obtaining as a result a greater cellular growth in the Bristol culture medium and with an exponential phase on days 6, 7, 8 and 9, which resulted in a production of biomass 0.495g / L.

Finally, protein content analysis of the biomass obtained in Bristol and BG11 culture medium was performed, yielding 38.13% and 34.58% respectively.

Keywords

Microalga, Limoncocha, isolate, biomass, protein

1. INTRODUCCION

Las proteínas son macromoléculas con una estructura química compleja, y esta complejidad es la base de sus múltiples características fisiológicas, morfológicas, y usos tecnológicos. Las proteínas se pueden usar como única proteína concentra o puede integrarse en alimentos procesados (Batista, Ana Paula; Gouveira, Narcisa; Franco, José; Raymundo, Anabela, 2013).

La búsqueda de nuevas fuentes de proteínas para complementar las fuentes convencionales existentes ha desencadenado un estudio profundo a los compuestos nutricionales de las microalgas y su contenido de proteínas. Las proteínas microalgales exhiben un buen contenido nutricional y funcional cuando se compara con algunos concentrados de proteína convencionales. La proteína extraída de cultivos puros o mixtos de algas hace referencia a la proteína de célula única (SCP), que son utilizadas como un sustituto de la fuente convencional de proteína explotada para el consumo de humanos y animales (Bressani, 2016).

Las proteínas son uno de los macronutrientes esenciales para que nuestro organismo funcione, son responsables de tareas tan básicas como la formación y reparación de tejidos, como los músculos y los tendones; del transporte de oxígeno, nos aportan energía, etc. Por eso el déficit de proteínas puede tener graves consecuencias para nuestra salud (Bressani, 2016). En los países del tercer mundo la deficiencia de proteínas es una de las grandes culpables de la muerte por desnutrición, en especial entre los más pequeños. (Dalais & Ebeling, 2002).

Una solución potencial al problema señala a las proteínas vegetales, pues están disponibles en gran cantidad y se han realizado enormes esfuerzos para que sus propiedades organolépticas se asemejen a las de la carne (Valentas, 1991).

Las microalgas se encuentran presentes en el agua, suelo y la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos, son organismos unicelulares, eucariotas y autótrofos que realizan la fotosíntesis oxigénica y se desarrollan en condiciones ambientales extremas por lo que se trata de un grupo polifilético (Graham, 2000), se encuentran ampliamente distribuidas en la biosfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones (Gómez, 2007). Utilizan la energía solar para transformar las aguas residuales en CO₂ y biomasa rica en lípidos, azúcares, proteínas o hidratos de carbono

(Michaux, 2010). Son una extraordinaria fuente de compuestos naturales, también son capaces de aportar un alto contenido nutricional proteico para peces, crustáceos y moluscos; y el hombre, además de ofrecer facilidades de manejo en sistemas de cultivo tanto en laboratorio como en producción a gran escala con fines comerciales. Al ser organismos unicelulares, tienen una capacidad de crecimiento y de generación de biomasa mucho mayor que las plantas superiores, ya que no necesitan formar estructuras reproductoras, lo que les permite duplicarse en cuestión de horas

Las microalgas tienen una composición bioquímica compleja debido a la presencia del aparato fotosintético, que le da una gran riqueza en pigmentos y componentes como citocromos y ácidos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) (Morales, 2012). Esto resulta en un elevado contenido en productos de alto valor, como los carotenoides luteína y astaxantina.

A pesar de su simplicidad y la alta distribución que tienen, son necesarios algunos factores ecológicos limitantes, como la radiación luminosa, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y la concentración de determinados nutrientes, para la colonización y su desarrollo. (Gómez, 2007).

Proceso de producción de microalgas

▪ Cultivo de microalgas

En el cultivo masivo de microalgas el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable, un suministro mínimo de nutrientes y microelementos y adecuadas condiciones químicas y físicas: luz, aireación, temperatura, salinidad y energía

Son varios los factores que afectan a la producción de microalgas. Para su desarrollo requieren de CO₂, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros nutrientes menores como metales, los cuales son esenciales porque actúan como cofactor de enzimas esenciales del metabolismo de las microalgas (Fogg & Thake, 1987).

▪ Parámetros Físico-Químicos

- La iluminación se divide en dos componentes: la irradiancia, la cual se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las

- microalgas, y el fotoperiodo, el cual es el número de horas durante el día en las que las microalgas son sometidas a dicha irradiación. (Baker, 1997).
- En cuanto a la temperatura, la mayoría de las especies crecen entre 10 a 35 °C, con una temperatura óptima de 16-27 °C (García, 2015). En el cultivo de microalgas, y en general en el de cualquier microorganismo, hay tres temperaturas a considerar: una temperatura mínima, por debajo de la cual no es posible el crecimiento (aunque depende de cada especie y condiciones de cultivo, aproximadamente 16°C), una temperatura óptima, entre 16 y 27 °C dependiendo de la microalga, a la que se produce el crecimiento más rápido, y una temperatura máxima, alrededor de 35 °C, por encima de la cual no es posible el crecimiento. Los cultivos de microalgas que crecen por debajo de la temperatura óptima generalmente son más sensibles a la fotoinhibición que aquellos que se mantienen en el valor ideal. La temperatura de crecimiento también afecta a la composición bioquímica de las células. La temperatura es uno de las condiciones más importantes, su variación influencia diferentes procesos físicos y biológicos. A altas temperaturas, se incrementa la fluidez de membrana, la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos ocurre, y la solubilidad de gases necesaria para las funciones vitales de los microorganismos (O₂ y CO₂) cambian; cuando hay bajas temperaturas, se forman cristales de hielo, que dañan a las membranas citoplasmáticas (Hielscher, 1999).
 - La aireación es un factor importante para la homogeneización de los nutrientes y evitar la sedimentación de las microalgas. Un adecuado mezclado favorece una distribución homogénea de las células, de los metabolitos, el calor y la transferencia de gases a través de la interfase gas-líquido. Sin embargo, una agitación excesiva puede causar un estrés hidrodinámico llevando a una disminución en la tasa de crecimiento.
 - Bajo condiciones de presión altas se produce una densificación de lípidos, que lleva al daño de la pared celular y la membrana citoplasmática. Elevadas presiones pueden ser razón de un descenso de la velocidad de crecimiento celular y producción de biomasa debido a la supresión de

interacción de proteínas con sustratos, además de la inactivación enzimática (Abe, 2007)

- La tolerancia a la salinidad depende de la especie considerada (de agua dulce o salada) (Segoviano, 2017).

Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas en cultivo se encuentran, entre otras cosas, el balance entre los macronutrientes específicos y los micronutrientes.

Los nutrientes fundamentales son el carbono, los nitratos y los fosfatos. La disminución de la fuente de nutrientes es un factor limitante en el cultivo, por lo que resulta necesario el control de la calidad nutricional en los cultivos masivos.

Hay algunas microalgas que, además de macro y micronutrientes, requieren otras sustancias para su desarrollo, como las vitaminas, ya que no son capaces de sintetizar todas las que necesitan y las tienen que asimilar a través del medio. Además requieren otros elementos en pequeñas cantidades que son esenciales para su crecimiento: manganeso, zinc, cobalto, cadmio, cobre, molibdeno y níquel, los cuales forman parte de enzimas necesarias para el transporte de electrones, la fijación y transporte del CO₂, la transcripción del ADN, la fijación y transporte del nitrógeno, entre otras (Segoviano, 2017).

La tasa de O₂ y CO₂ suministrado al cultivo puede convertirse en un factor limitante. Mejorando la circulación o mediante la adición adecuada de CO₂ o bicarbonato de sodio puede provocarse la prolongación del crecimiento exponencial de las microalgas. El CO₂ y el bicarbonato de sodio afectan al pH del cultivo, el cual debe ser controlado y mantenido en condiciones óptimas. Cada microorganismo crece en un intervalo de pH particular y normalmente existe un pH óptimo bien definido; en el caso de las microalgas el pH óptimo se encuentra apenas por encima de la neutralidad, por lo que son clasificados como microorganismos neutrófilos (García, 2015).

Además de los factores fisicoquímicos mencionados anteriormente, otro aspecto a considerar es la relación entre las microalgas con determinadas bacterias. Es difícil producir un cultivo de microalgas libre de bacterias y muchas especies de microalgas crecen mejor en asociación con bacterias, siendo este concepto muy importante para utilizar las microalgas como depuradores de determinadas aguas, como aguas residuales, de minería, etc. (Graham, 2000).

Todos estos factores son los que dirigen el comportamiento de las microalgas tanto en el medio natural como en los sistemas de cultivo.

- **Producción de microalgas en el laboratorio**

Las algas pueden ser cultivadas de diferentes maneras. El cultivo en laboratorio permite el control de variables como la iluminación, la temperatura, los niveles de nutrientes, la contaminación, mientras que en el exterior se hace muy difícil el crecimiento de microalgas durante amplios periodos.

A la hora de producir una determinada microalga es fundamental partir de un inóculo en perfectas condiciones, con células activas y libres de contaminaciones. Además del control de los parámetros antes mencionados, es necesario considerar que, para el establecimiento de un sistema de producción de microalgas, es importante el dominio de las técnicas de aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas, así como el conocimiento de la fisiología, ciclo de vida, bioquímica, etc. de las especies, ya que todo va a determinar su factibilidad de cultivo y, sobre todo, su contenido nutricional para posibles usos.

Son muchos los métodos que se han desarrollado para obtener cultivos de una sola especie y libre de contaminantes. Partiendo de un monocultivo sin contaminación se diluye en un mayor volumen en condiciones óptimas de crecimiento hasta conseguir la cantidad y calidad suficiente como para poder iniciar un cultivo masivo en laboratorio o a escala industrial

Scenedesmus sp

Es un alga verde unicelular, específicamente de la Chlorophyceae, que es un alga verde colonial pequeña e inmóvil que consiste en células alineadas en una placa plana. La célula contiene un único cloroplasto parietal con forma de placa con un solo pirenoide. Las paredes celulares pueden estar cubiertas de protuberancias o retículas que se ven mejor con microscopía electrónica de barrido.

Estas células de algas verdes son ubicuas y no móviles, y se encuentran ampliamente distribuidas en hábitats acuáticos, piscinas temporales de agua, cascadas, estanques, lagos y ríos. En zonas templadas son más abundantes en los ecosistemas de agua dulce (Gómez, 2007).

De acuerdo a Pérez Guadalupe la microalga *Scenedesmus sp* es considerada una especie que se caracteriza por su forma puntiaguda en los extremos y con arqueo, formada por 4

y hasta 8 células, también está constituido por algas verdes que se alinean en filas cortas de 4, 8 ó 16 células, a veces formando una hilera, otras veces alternando construyendo un diminuto zigzag. Se trata de un grupo representado por más de cien especies, todas ellas bastante comunes en el plancton de las aguas dulces. Las células centrales de las colonias de *Scenedesmus* suelen ser de lados rectos mientras que, con frecuencia, las situadas en los extremos, se curvan ligeramente para adoptar una forma de media luna, que muchas veces remata en dos apéndices largos como una espina

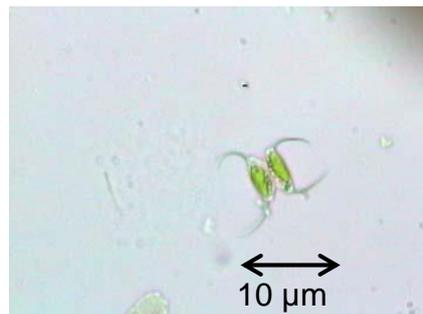


Figura 1: Vista microscópica de la microalga *Scenedesmus sp*

El objetivo de esta investigación fue el aislamiento de una cepa pura de la especie *Scenedesmus sp* de un consorcio procedente de la Laguna de Limoncocha mediante técnicas de aislamiento que permitan identificar por observación al microscopio óptico y el uso de claves dicotómicas. Asimismo, se procedió a la caracterización del contenido proteico de la cepa en dos medios de cultivo diferentes para determinar si esta especie puede ser utilizada en la industria alimentaria como un sustituto de la proteína convencional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El consorcio de microalgas provienen de la laguna de Limoncocha, que se encuentra ubicada en la Reserva Biológica Limoncocha del cantón Shushufindi de la provincia de Sucumbíos, en la región amazónica nortoriental del Ecuador, con coordenadas geográficas:

Latitud: -0.466667
 Longitud: -76.4667
 Altitud: 220 msnm
 Temperatura anual: 24.9 °C

Se cree que las áreas que ocupan las lagunas Limoncocha, Yanacocha y humedales adyacentes son antiguos meandros del Río Napo el que arrastra grandes cantidades de sedimentos provenientes de las estribaciones occidentales de los andes que son ricas en nutrientes como fósforo y nitrógeno, por lo que la laguna de Limoncocha alberga una gran cantidad de microorganismos como microalgas y cianobacterias.

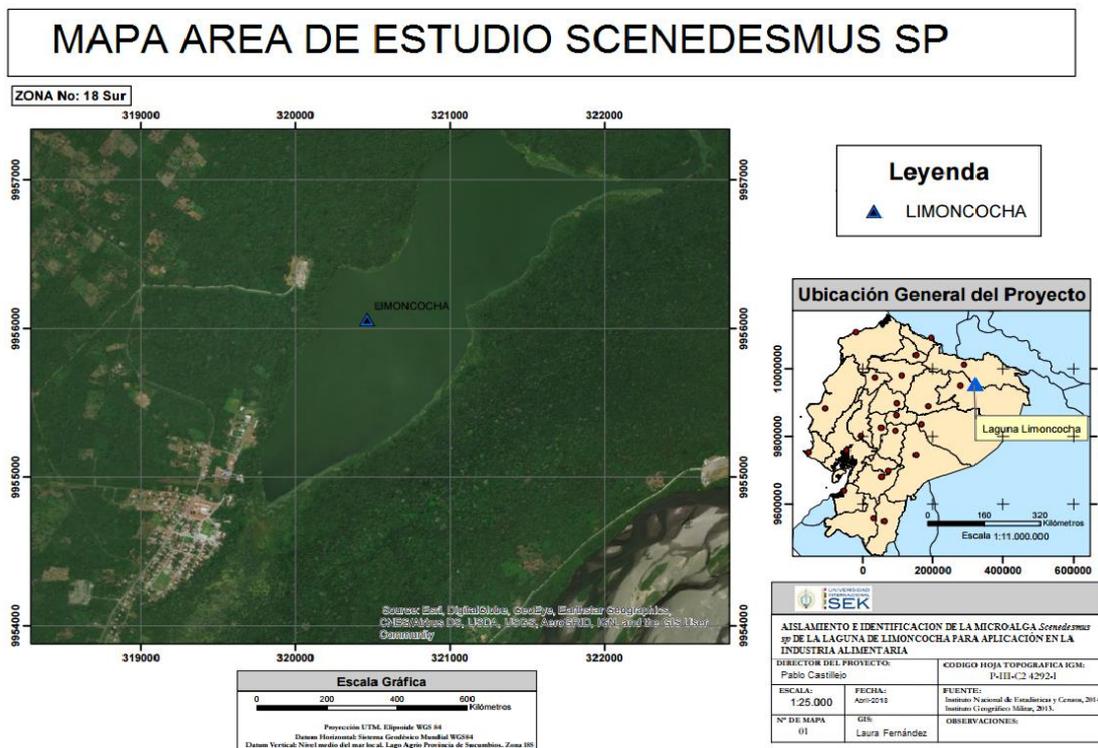


Figura 2: Ubicación de la laguna del Limoncocha, sitio de recolección del material vegetal

La investigación se llevó a cabo a nivel de laboratorio, en el laboratorio de investigación de la SEK y otra parte en el laboratorio de una reconocida empresa de bebidas del Ecuador. El periodo de investigación fue desde octubre del 2017 hasta marzo 2018, con una duración de 5 meses.

2.2 Aislamiento

Para el aislamiento de las cepas desde las muestras naturales se emplearon cinco técnicas (Morales, 2012):

1. Enriquecimiento: que consiste en diseñar condiciones de cultivo que favorezcan específicamente a las microalgas, para nuestro caso se inoculó la muestra en el medio líquido Bristol, se coloca 1mL en 100mL del medio y se deja propagar por 10 días a 20°C y con fotoperiodos 12:12 luz:oscuridad.
2. Diluciones seriadas: se toma 1 ml de la muestra y se diluye en 9mL en agua destilada estéril, se homogeniza y se toma 1 mL de esta disolución y se diluyen en 9mL en agua destilada estéril, así sucesivamente hasta tener 7 tubos de disoluciones. Cada muestra diluida es sembrada en medio sólido Bristol y se deja incubar por 10 días a 20°C y en fotoperiodos 12:12 luz:oscuridad .
3. Capilaridad: usando pipeta Pasteur de las placas viables se toma una colonia y se siembra en medio sólido Bristol, se incuba por 10 días a 20°C con fotoperiodos 12:12 luz:oscuridad (Fogg & Thake, 1987)
4. Adhesión a vidrio cubreobjetos: se toma de las placas en crecimiento una muestra microalgal y se lleva al microscopio. Se evidencia crecimiento de una sola especie. La cual es comparada con claves dicotómicas para identificación de microalgas y cianobacterias (Benítez, Telada, & Henao, 2015).

Todas las placas fueron observadas una vez por semana al microscopio.

Tras un periodo de incubación de 10 días de las diluciones seriadas realizadas los resultados obtenidos fueron:

Las diluciones seriadas en extensión de placa que presentan saturación en colonias (incontables) y presentan cultivos mixtos son las siguientes: 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4

Las diluciones seriadas en extensión de placa que presentan un número de colonias contables no saturado, así como distribuido y manejables son las siguientes: 10^5 , 10^6 , estas placas son factibles para obtener un cultivo axénico ya que estas diluciones no se encuentran saturadas y a la vez no se encuentran muy diluidas y pueden presentar colonias dentro de nuestro medio de cultivo.

2.3 Propagación

- Diseño experimental

Se procedió a definir 2 variables de diseño para evaluar la cinética de crecimiento; una variable cualitativa definida por el medio de cultivo: medio de cultivo A (bristol) y medio de cultivo B (BG-11); y otra variable cuantitativa definida por el método de contaje: Método X (contaje microscópico) método Y (medición de absorbancia óptica) con lo que se facilitó el estudio de la incidencia de estas variables en la determinación de la cinética de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* Con el fin de tener resultados confiables se realizó el ensayo por triplicado.

El diseño se definió así:

MEDIO DE CULTIVO	METODOS	
A (Bristol)	Método X (contaje)	Método Y (óptica)
B (BG-11)	Método X (contaje)	Método Y (óptica)

Tabla 1: Diseño experimental

Tomando las repeticiones del ensayo del diseño experimental final es:

	Repeticiones		
A	Ax1	Ax2	Ax3
	Ay1	Ay2	Ay3
B	Bx1	Bx2	Bx3
	By1	By2	By3

Tabla 2: Matriz Diseño experimental

- Procedimiento para la propagación

La propagación se realizó a nivel laboratorio tomando las siguientes consideraciones experimentales (Segoviano, 2017):

1. Esterilizar el medio de cultivos Bristol y BG11 a condiciones de 121°C y 1atm por 15 minutos
2. Dispensar 50mL de cada medio a temperatura ambiente en 3 tubos estériles VWR para centrifugación.

3. Añadir 1mL del cultivo inicial que se encuentra a una concentración de 150.000cel/mL
4. Acondicionar los tubos a temperatura ambiental (20°C) y someter a luz artificial por 12 horas y a oscuridad por 12 horas.
5. Realizar agitaciones manuales cada 24 horas

- **Contaje Celular**

a. Método X microscópico

Mediante el uso de la cámara de Neubauer se realiza el contaje celular siguiendo el procedimiento establecido (García, 2015):

1. Tomar 100uL de la muestra.
2. Dispensar en la cámara que ya contiene sobre ella el cubre objeto.
3. Realizar un contaje en L o en X de tal manera que se visualicen 5 cuadrados.
4. Aplica la siguiente fórmula:

$$M = \frac{n}{x} * 25 * 10000$$

Dónde:

M: número de células por mL

n: número de células contadas en X cuadrados

x: número de cuadrados en que se realizó el contaje

25: número de cuadrados de la cámara

10000: factor constante

5. Para realizar un contaje donde el número de células es difícil de separar, se realiza un dilución:

5.1 Se toma 1 mL del cultivo y se disuelve en 9mL de ácido acético al 10%.

5.2 Se homogeniza y se lleva al microscopio, para el cálculo se multiplica por el factor de dilución, aplicando la siguiente ecuación:

$$M = n * 250000 * 10$$

Dónde:

M: número de células por mL

n: número de células contadas en 5 cuadrados y divididos para 5

10: factor de dilución

b. Método Y densidad óptica (Sbarra, 1997)

Para este método se consideró realizar lecturas por medio de un espectrofotómetro con celdas de vidrio de 1cm y con una amplitud de onda 675nm dado que a este valor es cercano al pico de absorción de la clorofila.

1. Encender el espectrofotómetro y pasar un blanco con el medio de cultivo.
2. Homogenizar el cultivo y tomar con una pipeta 3500uL.
3. Dispensar en la celda de vidrio, evitando hacer burbujas.
4. Limpiar las paredes con papel de manos e introducir la celda en el espectrofotómetro.
5. Registrar la lectura a 675nm.

2.4 Obtención de la biomasa

Dada la mínima escala a la que se trabajó, se utilizó el método de centrifugado (Hielscher, 1999):

1. Introducir los tubos con el cultivo a la centrifuga, considerando el tamaño de la célula se trabajó a 2000 rpm por 10 minutos.
2. Se extrae el sedimento y se forma una sola masa.
3. Para realizar una lisis celular se utiliza el método de ondas de ultra sonido (Hielscher, 1999), para esto se coloca la masa en 5mL de solución buffer de extracción y se somete a vibración ultrasónica por 60 segundos y por 2 repeticiones.
4. Se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Finalmente, el pellet obtenido someter al secado en estufa por 3 horas a 105°C.

2.5 Cuantificación del contenido proteico

Se cuantificó proteínas mediante el método de Biuret, tomando como referencia la recta estándar de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) (Gómez, 2007).

Se prepara el reactivo de Biuret de acuerdo a la teoría y se procede así:

1. De la biomasa obtenida se pesa 25mg y se disuelve en 1mL de solución Buffer de extracción
2. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
3. Retirar el sobrenadante con una pipeta y pasarlo a otro tubo limpio

4. Al tubo con sobrenadante añadir 4 mL de reactivo de Biuret y agitar suavemente, dejar reposar 60 minutos.
 5. Medir en una celda de vidrio a una amplitud de onda de 540nm y contra un blanco de agua destilada.
 6. Se compara la absorbancia con la recta estándar de BSA.
- La Figura 3 muestra los valores con los que se construyó la recta estándar para el cálculo de porcentaje de proteína por el método de Biuret

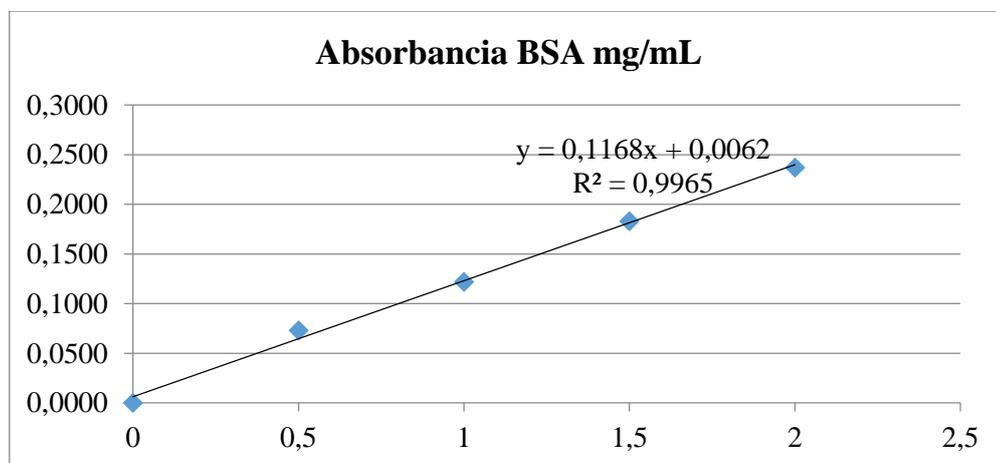


Figura 3: Recta estándar de BSA

3. RESULTADOS

3.1 Identificación

Según las micrografías obtenidas de las placas 10^5 , 10^6 y las claves dicotómicas (Wehr, Sheath, & Kociolek, 2015), se puede identificar que la especie predominante es perteneciente al género *Scenedesmus*, de la división Chlorophyta.

En la Figura 4 se observa colonias formadas por grupos de 4 células, con una organización en zigzag, cuerpo celular alargado en forma de huso con pared celular lisa, presentando las células externas una curvatura hacia dentro, y células esféricas de $4\mu\text{m}$

de diámetro, agrupas en cenobios de 2 a 4 cenobios organizados en línea o en forma alterna.

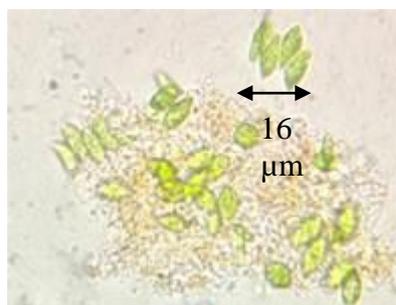


Figura 4: Vista microscópica de cultivo axénico de *Scenedesmus sp* con lente óptico 100x.

3.2 Propagación

Como se puede observar en la Figura 5, el crecimiento de *Scenedesmus sp* en el medio de cultivo Bristol tuvo una fase inicial de adaptación en los 4 primeros días, el crecimiento fue casi lineal, el aumento fue en promedio de 170000 células por día, en los días del 5to al 8vo se produce la fase exponencial con un crecimiento en promedio de 700000 células por día, y el 9no y 10mo se observa la fase estacionaria y muerte. En la Figura 5, en el medio de cultivo BG11 la fase de adaptación fue hasta el día 4to con un crecimiento diario en promedio de 50000 células, en los días del 5to al 8vo se produce la fase exponencial con un crecimiento diario en promedio de 300000 células, en los días 9no y 10mo se observa la fase estacionaria y de muerte. En ambos medios de cultivo las curvas de crecimiento presentan definidas las fases de crecimiento celular con una fase exponencial de 3 días. En el medio de cultivo Bristol el crecimiento en la fase exponencial fue 52.12% mayor que en medio de cultivo BG11.

La Tabla 1 muestra los resultados del contejo por cámara de Neubauer de la propagación del cultivo axénico de *Scenedesmus sp* en medio de cultivo Bristol.

Días	Ax1	Ax2	Ax3	$\bar{u} \pm \delta$
1	110000	115000	101500	108833 \pm 5572
2	155000	165000	145500	155166 \pm 7961
3	296500	301500	290500	296166 \pm 4496
4	464500	510500	445500	473500 \pm 27288
5	797000	818500	773000	796166 \pm 18584
6	1463500	1593500	1450500	1502500 \pm 64565
7	2828500	2877500	2800000	2835333 \pm 32006
8	3950000	3962500	3940000	3950833 \pm 9204
9	4302500	4361000	4284500	4316000 \pm 32657
10	4200500	4207000	4199500	4202333 \pm 3324

Tabla 1: Contaje celular donde Ax1, Ax2 y Ax3 representa al contaje celular de las de la combinación Bristol-Contaje

- La Figura 5 muestra la curva de crecimiento de *Scenedesmus sp* determinado por contaje celular en medio Bristol.

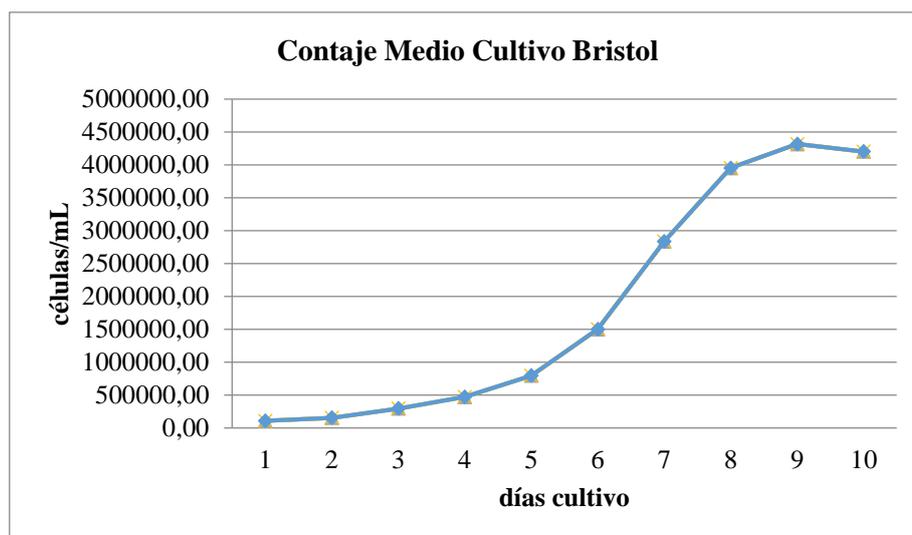


Figura 5: Cinética de crecimiento por contaje celular de *Scenedesmus sp* en Bristol

- La Tabla 2 muestra los resultados de la medición por absorción óptica de la propagación del cultivo axénico *Scenedesmus sp* en medio de cultivo Bristol.

Días	Ay1	Ay2	Ay3	$\bar{u} \pm \delta$
1	0,2956	0,2959	0,2928	$0,2948 \pm 0,0014$
2	0,2964	0,2971	0,2957	$0,2964 \pm 0,0006$
3	0,2991	0,2997	0,2971	$0,2986 \pm 0,0011$
4	0,3028	0,3051	0,3001	$0,3026 \pm 0,0020$
5	0,3069	0,3099	0,3033	$0,3067 \pm 0,0027$
6	0,3458	0,3487	0,3418	$0,3454 \pm 0,0028$
7	0,3625	0,3657	0,3599	$0,3627 \pm 0,0024$
8	0,4025	0,4075	0,4002	$0,4034 \pm 0,0030$
9	0,4121	0,4198	0,4108	$0,4142 \pm 0,0040$
10	0,4156	0,4179	0,4133	$0,4156 \pm 0,0019$

Tabla 2: Contaje celular donde Ay1, Ay2 y Ay3 representa al contaje celular de las de la combinación Bristol-Absorción

- La Figura 5 muestra la curva de crecimiento de *Scenedesmus sp* determinado por absorbancia óptica en medio Bristol.

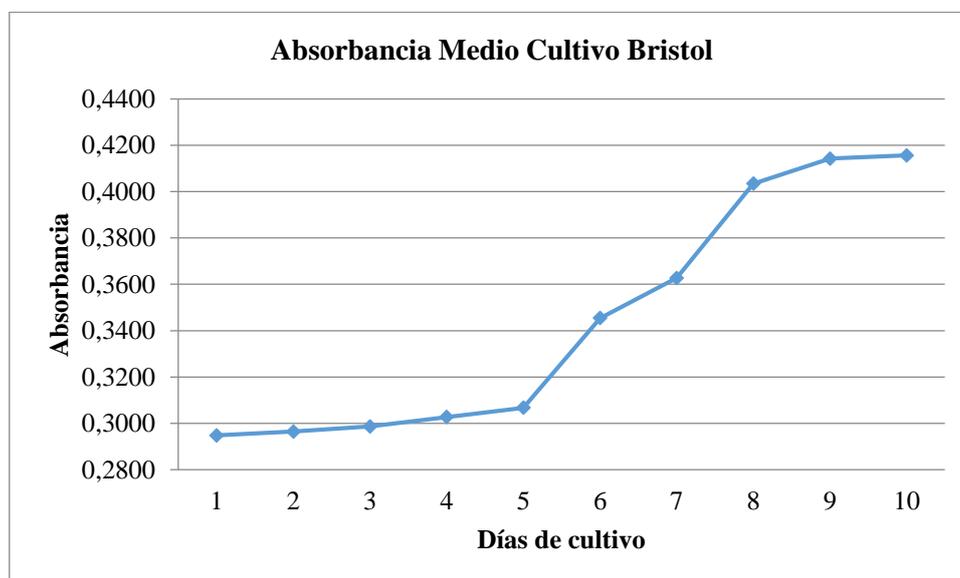


Figura 6: Cinética de crecimiento por absorbancia óptica de *Scenedesmus sp* en Bristol

- La Tabla 3 muestra los resultados del contejo por cámara de Neubauer de la propagación del cultivo axénico de *Scenedesmus sp* en medio de cultivo BG-11.

Días	Bx1	Bx2	Bx3	$\bar{u} \pm \delta$
1	109000	115500	114500	113000 \pm 2857
2	113000	128000	117500	119500 \pm 6284
3	164000	169000	168000	167000 \pm 2160
4	211000	219500	215500	215333 \pm 3472
5	310000	319500	314500	314666 \pm 3880
6	625000	633500	629500	629333 \pm 3472
7	812500	818000	817000	815833 \pm 2392
8	1823500	1828850	1828000	1826783 \pm 2347
9	1802500	1808450	1807000	1805983 \pm 2533
10	1810000	1815000	1814500	1813166 \pm 2248

Tabla 3: Contaje celular donde Bx1, Bx2 y Bx3 representa al contaje celular de las de la combinación BG-11-Contaje

- La Figura 7 muestra la curva de crecimiento de *Scenedesmus sp* determinado por contejo celular en medio BG-11.

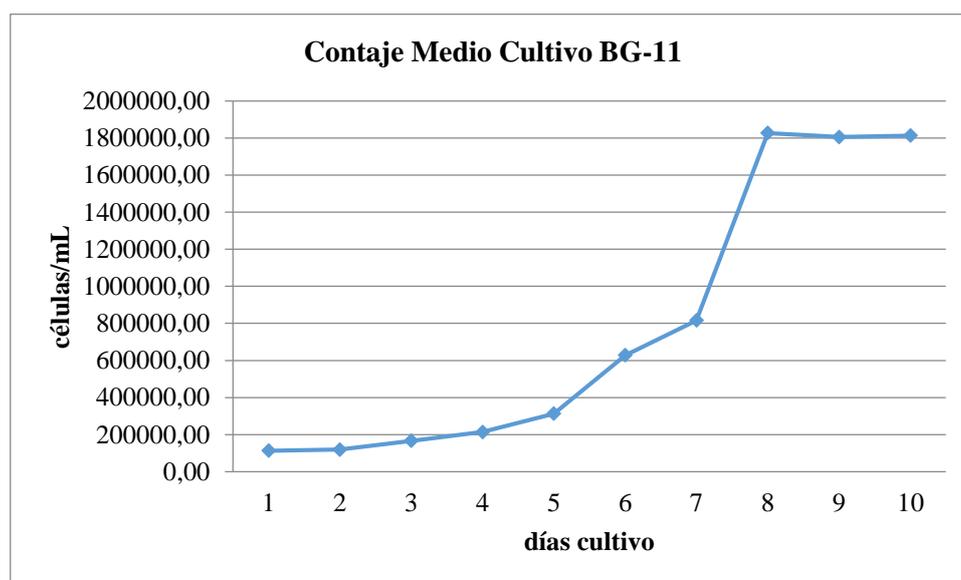


Figura 7: Cinética de crecimiento por contejo celular de *Scenedesmus sp* en BG11

- La Tabla 4 muestra los resultados de la medición por absorción óptica de la propagación del cultivo axénico *Scenedesmus sp* en medio de cultivo BG11.

Días	By1	By2	By3	$\bar{u} \pm \delta$
1	0,2935	0,2941	0,2938	$0,2938 \pm 0,0002$
2	0,2938	0,2963	0,2947	$0,2949 \pm 0,0010$
3	0,2944	0,2955	0,2961	$0,2953 \pm 0,0007$
4	0,2951	0,2967	0,2654	$0,2857 \pm 0,0144$
5	0,2987	0,2995	0,2994	$0,2992 \pm 0,0004$
6	0,3017	0,3028	0,3022	$0,3022 \pm 0,0004$
7	0,3125	0,3184	0,3169	$0,3159 \pm 0,0025$
8	0,3528	0,3592	0,3581	$0,3567 \pm 0,0028$
9	0,3558	0,3587	0,3585	$0,3576 \pm 0,0013$
10	0,3595	0,3591	0,3589	$0,3591 \pm 0,0002$

Tabla 4: Contaje celular donde By1, By2 y By3 representa al contaje celular de las de la combinación BG11-Absorción

- La Figura 8 muestra la curva de crecimiento de *Scenedesmus sp* determinado por absorbancia óptica en medio BG11.

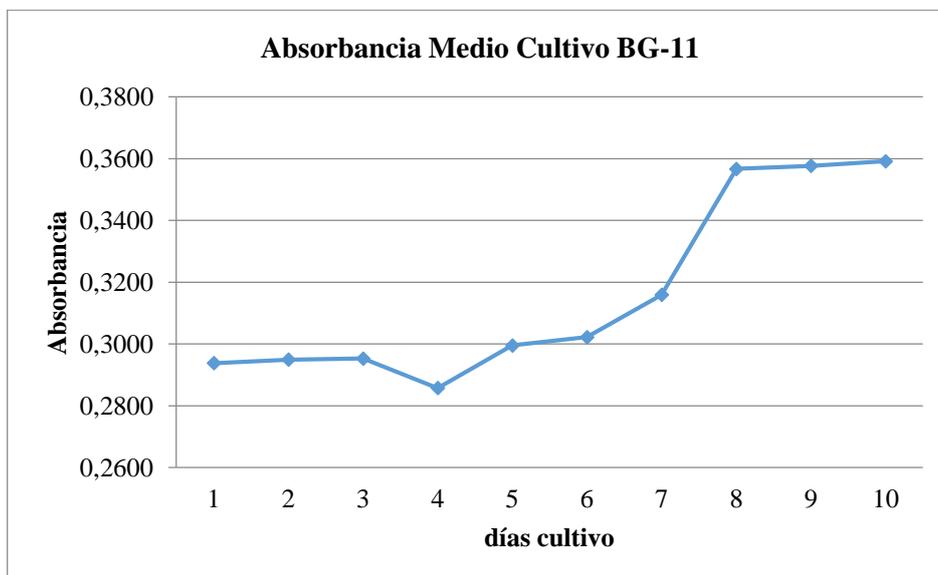


Figura 8: Cinética de crecimiento por absorbancia óptica de *Scenedesmus sp* en BG11

- La Figura 9 muestra la correlación del contejo celular y la absorbancia medida a 675nm de la propagación en medio de cultivo Bristol

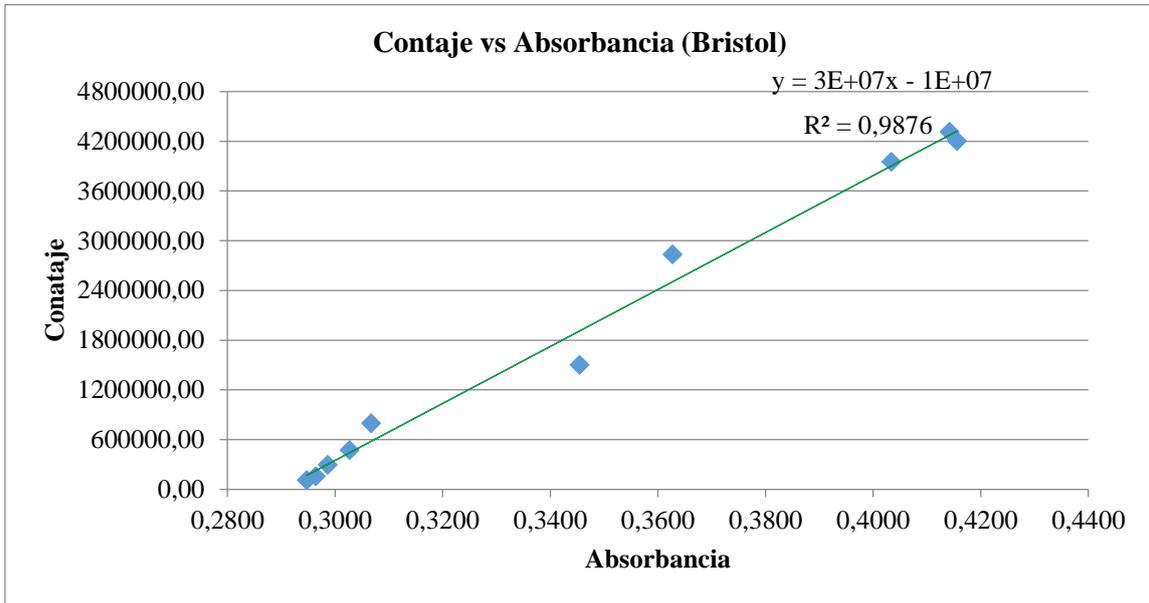


Figura 9: Correlación de contejo celular vs absorbancia (Bristol)

- La Figura 10 muestra la correlación del contejo celular y la absorbancia medida a 675nm de la propagación en medio de cultivo BG11

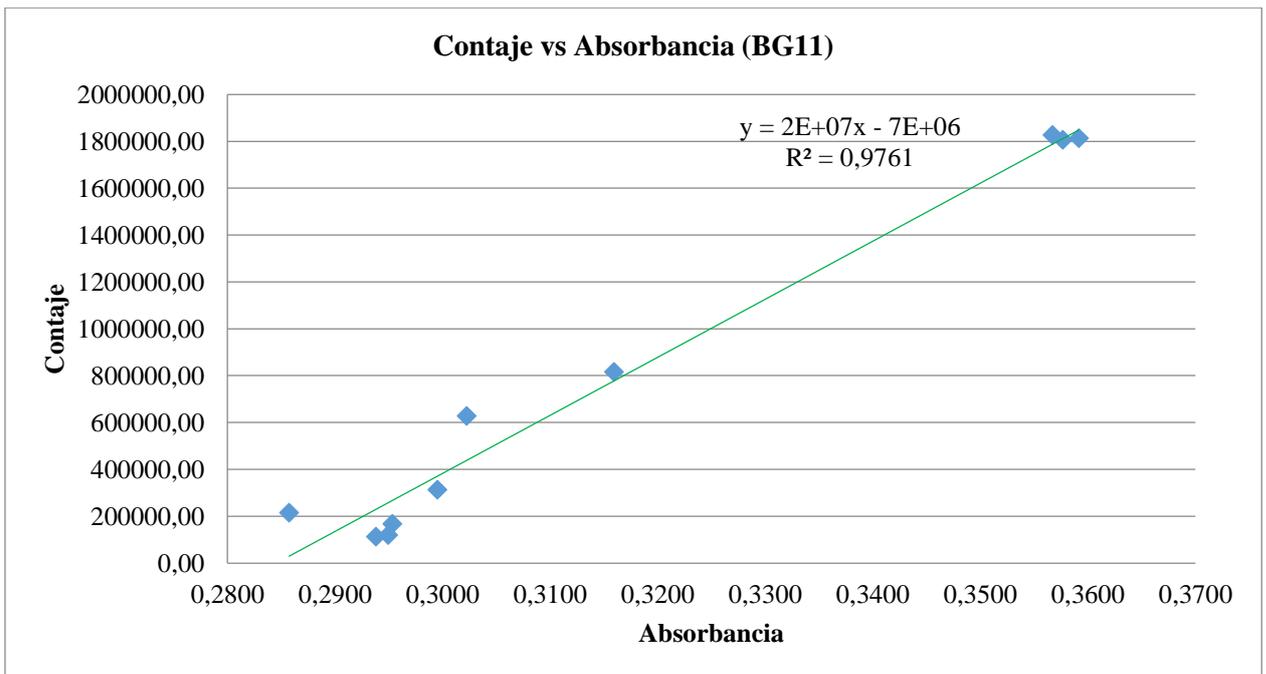


Figura 10: Correlación de contejo celular vs absorbancia (BG11)

- La Figura 11 muestra la relación entre la propagación en medio de cultivo Bristol y medio de cultivo BG11

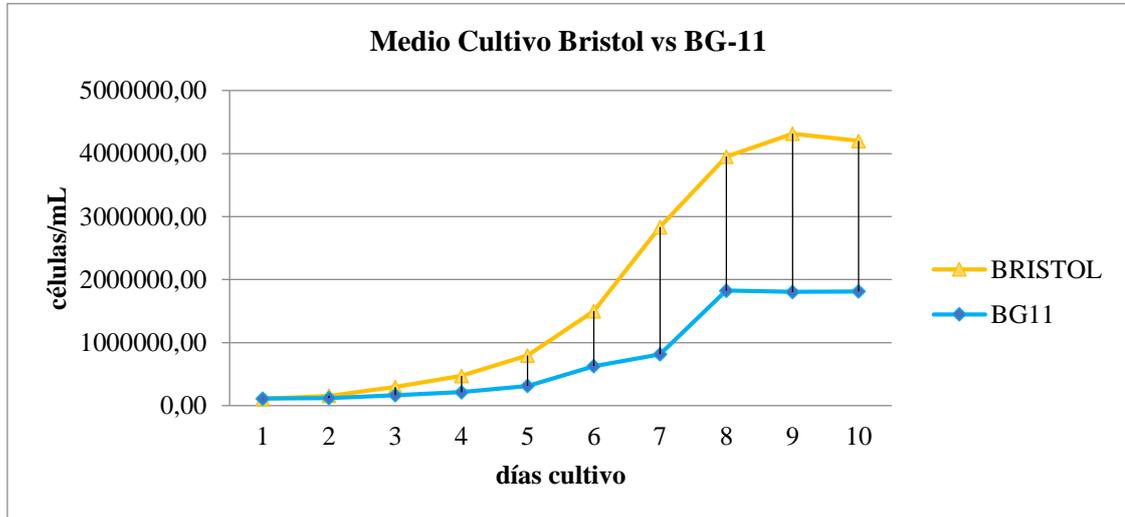


Figura 11: Crecimiento celular Bristol vs BG11

3.3 Obtención de biomasa y contenido proteico

La productividad de biomasa seca de *Scenedesmus sp* en medio de cultivo Bristol, como muestra la Tabla 5, fue mayor en un 46,02% en relación con la biomasa seca obtenida en el medio de cultivo BG11, como se observa en la Tabla 6.

En la Tabla 5 se observa que se obtuvo la mayor productividad de biomasa seca en medio Bristol y fue de 0,52g/L para el cultivo A3.

Para el contenido proteico, en la Tabla 7, se observa que el contenido proteico para la muestra obtenida en medio de Cultivo Bristol en promedio fue de 0.1884 g/L que equivale al 38.13%. En la Tabla 8, podemos observar que el contenido proteico para el cultivo BG11 fue de 0.0925 g/L que corresponde al 34.58%. Los valores proteicos obtenidos difieren en un 3.58%, que se considera una variación no significativa; el contenido proteico para *Scenedesmus sp*, cultivado en medio de Cultivo Bristol y BG11 no mantienen relación directa a la producción de biomasa.

- La Tabla 5 muestra la productividad de biomasa seca obtenida de la propagación de *Scenedesmus sp* en medio de cultivo Bristol.

Productividad de biomasa seca de <i>Scenedesmus sp</i> en medio de cultivo BRISTOL			
CULTIVO	g	L	g/L
A1	0,0225	0,05	0,450
A2	0,0257	0,05	0,514
A3	0,0261	0,05	0,522
TOTAL	0,0743	0,15	0,495

Tabla 5: Productividad de biomasa seca en Bristol

- La Tabla 6 muestra la productividad de biomasa seca obtenida de la propagación de *Scenedesmus sp* en medio de cultivo BG11.

Productividad de biomasa seca de <i>Scenedesmus sp</i> en medio de cultivo BG11			
CULTIVO	g	L	g/L
B1	0,0134	0,05	0,2680
B2	0,0129	0,05	0,2580
B3	0,0138	0,05	0,2760
TOTAL	0,0401	0,15	0,2673

Tabla 6: Productividad de biomasa seca en BG11

- La ratio de contenido proteico en el medio de cultivo Bristol es de 2,89 y en el medio de cultivo BG11 es de 2,62.

- La Tabla 7 muestra los resultados de contenido proteico de los cultivos en medio Bristol. Se reemplazó los valores de la fórmula de la recta estándar y se obtuvo:

Contenido de proteína (BRISTOL)			
CULTIVO	Abs 540nm	Proteina g/L	%Proteina
A1	0,0275	0,1824	40,53%
A2	0,0282	0,1884	36,65%
A3	0,0289	0,1943	37,23%
PROMEDIO		0,1884	38,13%

Tabla 7: Contenido proteico de *Scenedesmus sp* en medio Bristol

- La Tabla 8 muestra los resultados de contenido proteico de los cultivos en medio BG11. Se reemplazó los valores de la fórmula de la recta estándar y se obtuvo:

Contenido de proteína (BG11)			
CULTIVO	Abs 540nm	Proteina g/L	%Proteina
B1	0,0171	0,0933	34,82%
B2	0,0165	0,0882	34,18%
B3	0,0174	0,0959	34,74%
PROMEDIO		0,0925	34,58%

Tabla 8: Contenido proteico de *Scenedesmus sp* en medio BG11

4. DISCUSION DE RESULTADOS

- De acuerdo a Mitsufumi, et al. (2009), la especie *Scenedesmus sp.*, es una microalga que, dependiendo del estado de crecimiento, se encuentra en ovoides, las cuales son células esféricas de 2 a 6 μm de diámetro, sin embargo, posteriormente su morfología cambia a cenobios de 3 a 7 μm de ancho y de 11 a 20 μm , quienes se agrupan de 2 a 4 cenobios organizados en línea o en forma alterna. Para nuestro estudio, se observa desde cenobios individuales hasta asociaciones de 4 cenobios con un largo máximo de 16 μm -. Según Parra & Bicudo (1996). Las microalgas se clasifican de acuerdo a caracteres establecidos como naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, presencia y número de flagelos, metabolitos de reserva entre otros, para dar lugar a divisiones y clases según el énfasis que los investigadores le otorgan a estos caracteres, para nuestro estudio, cumple con las cualidades otorgadas a la División Chlorophyta y Clase Chlorophyceae. Para Volker, et al. (1999) las microalgas de esta división constan de células fusiformes, de color verde, se reconocen cloroplastos, formas unicelulares y autoesporas como se observa en la Figura 2.
- La intensidad de luz, la temperatura y la concentración de nutrientes son factores importantes en la regulación del crecimiento del fitoplancton. En la investigación realizada por Voltolina, et al. (1999), encontraron que la temperatura tuvo un efecto más acentuado que la iluminación en el deterioro de crecimiento de *Scenedesmus*. Ellos encontraron que a una temperatura de 15 °C se inhibe el crecimiento de esta microalga y a 30 °C crece lentamente. Sin embargo, en esta investigación se encontró que a pesar de que durante los 10 días de crecimiento, entre las 23:00 y 4:00 horas se tuvo temperaturas ambientales entre los 7 y 13 °C, no se evidenció anomalías en las curvas de crecimiento cinético en ambos medios. En cuanto a los fotoperiodos, Shih-Hsin, et al. (2012) en su estudio probaron tres fotoperiodos luz:oscuridad de 8:16, 12:12 y 24:0, encontrando que con el fotoperiodo de 8:16, la velocidad de división disminuyó significativamente, en nuestro estudio se realizó fotoperiodos de 12:12 sin encontrar variabilidad en su curva de crecimiento en relación a fotoperiodos 8:16 y 24:0. En el trabajo realizado por Tripathi & Gaur (2006) sobre el comportamiento fisiológico de *Scenedesmus* durante la exposición de Cu y Zn, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre dos medios de cultivo utilizados a pesar de

que el medio F cuadruplica la cantidad de nutrientes respecto al medio T. Para nuestro estudio si se observa una diferencia en el crecimiento celular, esto implica que las concentraciones de nutrientes en BG11 no son suficientes para un crecimiento adecuado de la especie. Según Chem et al. (2013) los macronutrientes que requiere la microalga *Scenedesmus sp* deben ser mayormente sales de cloruro de sodio y magnesio, y sulfatos. En nuestro estudio, los porcentajes de estos elementos son mayores en un 25,26% en el medio Bristol. Finalmente se demuestran que el contenido nutritivo de Bristol y condiciones físicas a las cuales se desarrolló nuestro estudio fueron aptas para *Scenedesmus sp*.

- En nuestro estudio el valor de biomasa obtenido es mayor a los reportados por Chinnasamy (2009), quién en su estudio de crecimiento microalgal con variaciones de las condiciones de CO₂ y temperatura, tuvo valores de producción de biomasa entre 0,32g/L y 0,42g/L. Por el contrario, la producción de biomasa de este estudio estuvo por debajo del valor reportado por González & Cañizares (1998), donde se efectuaron cultivos microalgales variando las concentraciones de nitrógeno y fósforo y se obtuvo valores de producción de biomasa de 0,53g/L. La diferencia entre los resultados obtenidos está dada por la disponibilidad de macronutrientes que requieren las microalgas para mantener niveles óptimos de crecimiento, para *Scenedesmus sp* en este estudio, al no registrar mediciones de CO₂ se descarta la incidencia del mismo en la producción de biomasa seca.
- El contenido proteico depende principalmente por el suministro de nitrógeno del medio; el nitrógeno es el elemento principal en el crecimiento microalgal ya que forma parte de las proteínas y nucleótidos de la biomasa según Breman & Owende (2010). Para González & Cañizares (1998) la disposición de nitrógeno en ambos medios de cultivo está dada por el grupo nitrato NO₃ que resulta ser la forma mejor absorbida por las microalgas, por lo que a pesar de la diferencia de valores en la producción de biomasa esta no tuvo mayor relación en el ratio de producción de material proteico. El porcentaje proteico de la microalga *Scenedesmus sp* fue, en promedio, de 36,2% lo que la hace un nutriente de alta calidad comparable con la proteína vegetal de la soya (Valentas, 1991), y; le

proporciona un valor importante dentro de la industria alimentaria como fuente de proteína.

5. CONCLUSIONES

- La combinación de técnicas de enriquecimiento con diluciones seriadas resulta un método idóneo para obtener un cultivo axénico de un consorcio no saturado.
- Las condiciones de cultivo dispuestas a una temperatura de 20°C, con fotoperiodos de 12:12 (luz-oscuridad) favorecen el crecimiento exponencial de la cepa *Scenedesmus sp.*
- Tener un cultivo axénico favorece la aplicación de un método indirecto para la determinación del crecimiento celular mediante densidad óptica al tener unas correlaciones altas.
- En relación a la productividad de biomasa microalgal, para *Scenedesmus sp.*, un medio de cultivo rico en sales favorece su rendimiento a escala laboratorio.
- El método de ruptura celular por ondas ultrasónicas como pretratamiento para determinación de proteínas por el método de Biuret resulta una opción aceptable ya que los valores obtenidos son comparables a los resultados obtenido por González & Cañizares (1998) en su estudio sobre la incidencia del N₂ en la producción de proteína algal .
- En la actualidad con una visión de lograr que sea mejor el sistema socio económico en el Ecuador, cuando la soja es la proteína vegetal de origen terrestre más empleada como sustituto de la proteína convencional, las preocupaciones ambientales se originan por el uso de la tierra y los requerimientos de fertilizantes asociados con la producción de soja, en nuestro estudio, la producción de *Scenedesmus sp.*, se considera rentable ambientalmente al no requerir acondicionamientos de CO₂ artificial ni fotoperiodos de 24:0; según Breman & Owende, 2010, las algas son un elemento clave en la disminución de la huella de carbono porque no solo consumen CO₂ sino que también consumen otros

nutrientes y microelementos que se encuentran en los residuales producidos por la agroindustria, la ganadería o la actividad urbana; por tanto se puede considerar que la aplicación a gran escala de la microalga *Scenedesmus sp.* como una fuente efectiva de proteína, no está limitada por acondicionamientos de producción y técnico, con lo que concluimos que estos resultados la hacen una especie recomendada para la producción industrial orientada al uso alimentario.

6. BIBLIOGRAFIA

- Baker, D. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition*, 807-813.
- Basham, L. M. (1995). Removal of ammonium and phosphorus ions synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. 174--182.
- Batista, Ana Paula; Gouveira, Narcisa; Franco, José; Raymundo, Anabela. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Benítez, S., Telada, L., & Henao, D. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. 43-54.
- Bravo. (2012). Caracterización de microalgas de la laguna de Limoncocha y optimización de las condiciones de cultivo in vitro para la obtención de biomasa. 512-519.
- Breman, M., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production,. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 557-577.
- Bressani, R. (2016). Legumes in human diets and how they might be improved. *Protein Advisory Group of the United Nations Systems*, 15-42.
- Chem, L., Wang, C., Wang, W., & Wei, J. (2013). Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*, 133, 9-15.
- Chinnasamy, S. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂. 518-538.
- Dalais, F., & Ebeling, P. (2002). Soy protein supplementation increases serum insulin-like growth factor-I in young and old men but does not affect markers of bone metabolism. *Eur J Nutr*, 100-108.
- Fogg, G., & Thake, B. (1987). *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*. 269.
- Fraunhofer. (1963). BBM-Medium (Bold's BAsal Medium + soil extract+vitamins). 6318.
- García, M. d. (2015). Producción de microalgas con fines biotecnológicos. *Cuadernos de estudio agroalimentario*, 89.
- Gómez, L. (2007). Microalgas, aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 3-20.
- Gonz, A. D. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. 53-60.

- González, A., & Kafarov, V. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. 37-39.
- González, L. E., & Cañizares, R. O. (1998). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. 37-39.
- Graham, L. (2000). Introduction to the Algae. 1-20.
- Hielscher. (1999). Lisis por ultrasonidos: Ruptura celular & Extracción. *Tecnología de ultrasonidos*, 25-27.
- Hong-Yu, R., Bing-Feng, L., Chao, M., & Lei, Z. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 265-285.
- Illman, A., Scragg, A., & Shales, S. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol*, 27, 631-635.
- Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66, 486-496.
- Michaux, C. P. (2010). Structural insights into the acidophilic pH adaptation of a novel endo-1. 1407-1415.
- Mitsufumi, M., Yoshiaki, M., & Hiroshi, S. (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward biofuel production. *Biotechnology Letters*, 31-36.
- Morales, A. E. (2012). Manual de Ficología relacionado con la bioprospección, aislamiento, cultivo, bioquímica y biotecnología de microorganismos fotosintéticos. págs. 1905-1919.
- Parra, O., & Bicudo, C. (1996). Introducción a la biología y sistemática de las algas. *Universidad de Concepción*, 268.
- Pérez, V. C. (2017). Aislamiento, identificación de la microalga *Scenedesmus obliquus*. *Jóvenes en la ciencia*, 145.
- Ramakrishnan, B., & Chinnasamy, S. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂. 518-538.
- Sánchez, G. (2010). *Comprobación de actividad tintorera en fibras orgánicas y sintéticas*. Honduras.
- Sbarra, A. (1997). Correlation between amniotic fluid optical density and L/S ratio. 50, 723-724.
- Segoviano, A. &. (2017). Estudio de la cinética de crecimiento de *Phormidium* sp en función de la concentración de nitrógeno para su aprovechamiento biotecnológico. 149-153.

- Shih-Hsin, H., Chun-Yen, C., & Jo-Shu, C. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.
- SINC . (2013). Primer perfil químico de las cinco microalgas más consumidas del mundo. *SINC*.
- Tripathi, B., & Gaur, J. (2006). Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma*, 229(1), 1-9.
- Valentas, K. (1991). Soy Complex. En *Food Processing Operations and Scale-up* (págs. 92-137). USA: Marcel Dekker Inc.
- Volker , A., Huss, R., & Frank, C. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Phycology*, 35(58-61).
- Voltolina, D., Cordero, B., & Nieves, M. (1999). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, 68(3), 265-268.
- Zhang, Endong, Z., Bing, W., Qihua, W., & Shubiao, Z. (2008). Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, 99(9), 3787-3793.

ANEXOS

Anexo A: Registro Fotográfico del experimento



Figura 9: Aislamiento y dilución seriada



Figura 10: Equipo de incubación y vista microscópica del cultivo seriado

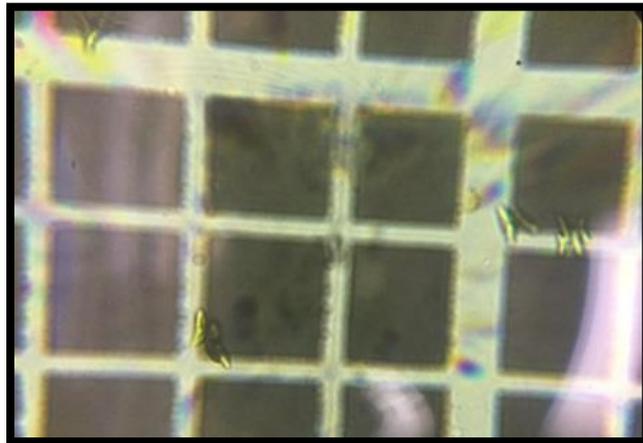
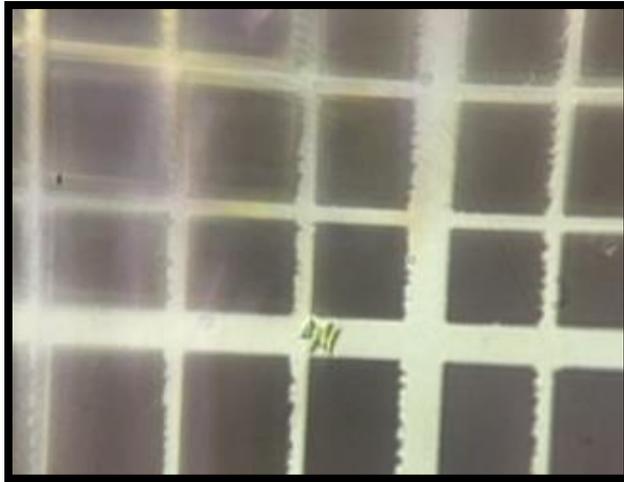
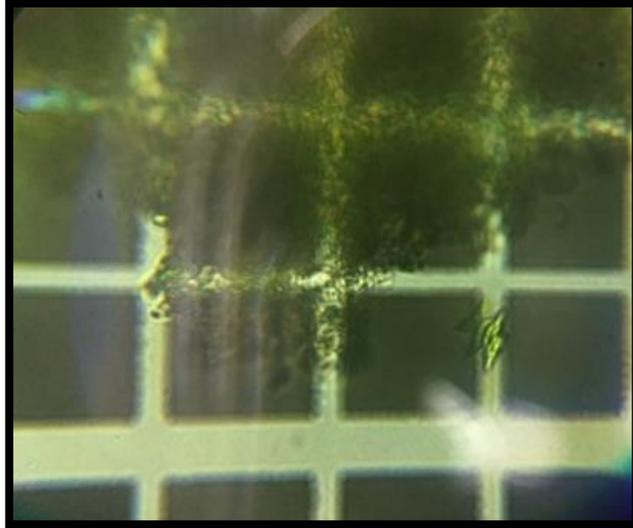


Figura 11: Conteo en cámara de Neubauer de *Scenedesmus sp*

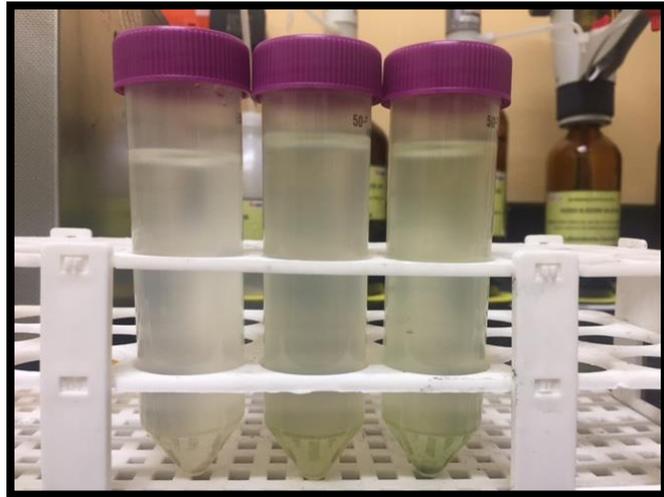


Figura 12: Crecimiento celular a escala de laboratorio



Figura 12: Obtención de biomasa

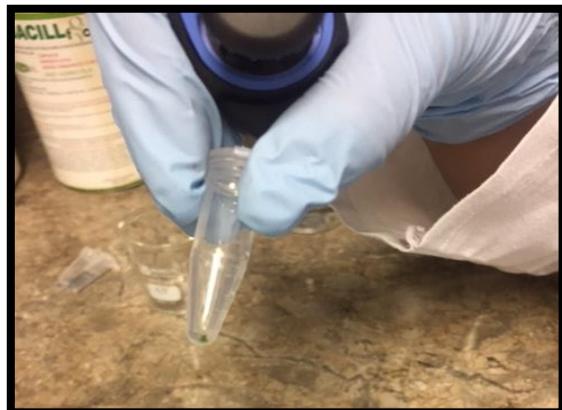


Figura 12: Lisis celular por ondas ultrasónicas



Figura 13: Análisis de proteína por método de Biuret

Anexo B: Resultados de identificación morfológica externa

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Ing. Laura Fernández
Proyecto: Análisis de Microalgas
Muestra Recibida: 02-abr-18
Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suspensión microalgal en medio de cultivo BRISTOL.
Análisis Completado: 09-abr-18
Número reporte Gruentec: 1804120-LIQ001

Rotulación Muestra:	M2G	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1804120-LIQ001	
Parámetros subcontratados[§]:		
Identificación de Microalgas ^{a1)}	Scenedesmus sp.	Método Interno ^{b1)}

(§) Parámetros realizados en laboratorios especializados. Gruentec se responsabiliza por los resultados emitidos.

a1) La identificación se realizó mediante técnicas microscópicas.

b1) Para la identificación microscópica, la muestra fue homogenizada, posteriormente se tomaron 100ml de la suspensión microalgal, para ser observadas a 100X en el microscopio.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

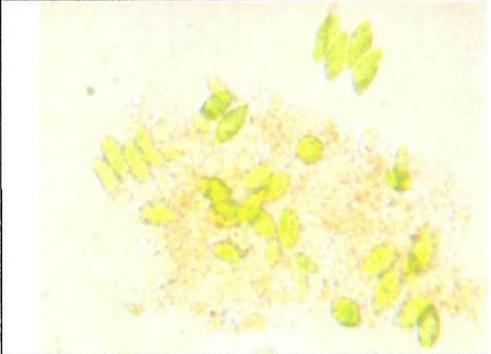
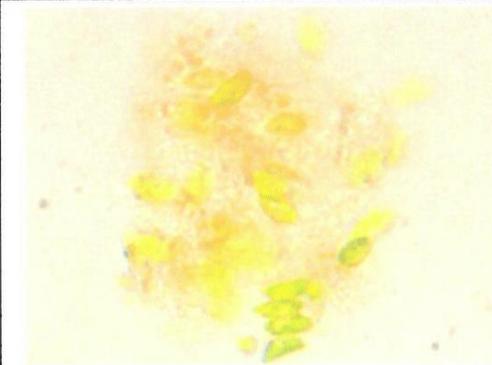
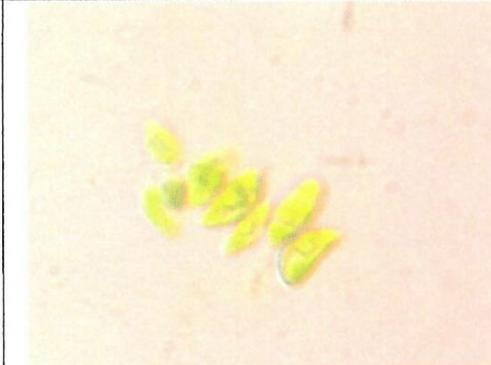
Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS
ABRIL 2018

MICROGRAFÍAS

MUESTRA M2G	
	
M2G-1	M2G-2
	
M2G-3	M2G-4
	
M2G-3	M2G-4