

Crecimiento poblacional de *Chlorella minutissima* (Fott & Nováková, 1969), en dos medios de cultivo en un sistema artesanal.

DANIELA BENITO REVOLLO LAMBERTINO

**Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Biología
Montería – Córdoba
2022**

Crecimiento poblacional de *Chlorella minutissima* (Fott & Nováková, 1969), en dos medios de cultivo en un sistema artesanal.

DANIELA BENITO REVOLLO LAMBERTINO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga.

Director

MARTHA MOGOLLÓN ARISMENDY

**Bióloga Marina
M.Sc. Ciencias Ambientales**

Codirector

CAROLINA ARANGO RIVAS

**Bióloga
M.Sc. Biotecnología**

**Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Biología
Montería – Córdoba
2022**

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del trabajo será solo de los autores (Artículo 61 del estatuto de investigación y extensión de la universidad de Córdoba, acuerdo N° 093 del 26 de noviembre de 2002).

Nota de aceptación

MARTHA MOGOLLÓN ARISMENDY, M.Sc.

Universidad de Córdoba

Directora del trabajo de grado

CAROLINA ARANGO RIVAS, M.Sc.

Universidad de Córdoba

Codirectora del trabajo de grado

JORGE A. QUIRÓS RODRÍGUEZ

Universidad de Córdoba

Jurado Evaluador

ESCILDA RODRIGUEZ CALONGE

Universidad de Córdoba

Jurado Evaluador

Dedicatoria

Llena de regocijo, amor y esperanza, dedico esta tesis primeramente a Dios por brindarme salud, sabiduría y valentía para alcanzar la finalización exitosa de este proyecto. Resaltando que nada hubiese sido posible sin él.

A mis padres por su apoyo incondicional, su inmenso amor y sacrificio, por siempre confiar en mis capacidades y estar prestos a mis necesidades como hija.

A mis hermanos, a mi sobrino Samuel David, siendo un pilar fundamental en esta etapa de mi vida y a toda mi familia.

A mis compañeros, amores y amigos de vida Eder Conde Vega, Isaac Asís Herazo y Jair Torres Ortiz, por su grata y bendecida compañía desde el inicio de mi carrera universitaria, por cada experiencia vivida.

Por último pero no menos importante a mis Profesoras Martha Mogollón por ser soporte idóneo, por brindarme su confianza y a la profe Carolina Arango por su dedicación y apoyo. A todos mis docentes que aportaron a mi formación académica y a cada persona que de una u otra manera influyeron positivamente en este proceso académico.

Agradecimientos

Principalmente agradezco a Dios por su amor y misericordia, por fortalecer mi fé y brindarme sabiduría, ayudándome a enfrentar mis miedos y demostrarme que puedo lograr todo agarrada de su mano. Por enseñarme que su tiempo es perfecto.

A mis padres queridos por su amor y su buen ejemplo, por cada sacrificio realizado, de igual manera a mis hermanos, abuelos, tías y a mi familia en general que fueron apoyo incondicional.

A mis directoras Martha Mogollón y Carolina Arango por la orientación y dirección en cada fase de este proyecto, por brindarme su confianza y cariño, no será fácil retribuir todo lo brindado, infinitas gracias.

Agradecimiento a los jurados Escilda Rodríguez y Jorge Alexander Quirós, por la paciencia, por cada sugerencia y recomendación en este proceso.

Gracias a Isaac Asís por brindarme su valiosa amistad, a Jair Torres y Joiver Alean por todos los momentos vividos.

A Eder Conde vega por ser parte de este proceso, por su apoyo en los momentos buenos y los no tan buenos, por cada palabra de aliento.

Daniela Vegliante por el tiempo y apoyo brindado, muchas gracias.

A mis docentes, auxiliares de laboratorio, a todo el personal del programa de Biología. A la Universidad de Córdoba, por la oportunidad y por cada experiencia vivida, sumada de infinitas enseñanzas.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstratc.....	3
Introducción.....	5
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo General.....	7
2.2. Objetivo Especifico.....	7
3. Marco Teórico.....	8
3.1. Estado del arte.....	8
3.1.1. <i>Qué son los fertilizantes</i>	8
3.1.2. <i>Tipos de Fertilizantes</i>	8
3.1.2.1. <i>Fertilizantes orgánicos</i>	8
3.1.2.2. <i>Fertilizantes inorgánicos</i>	8
3.1.3. <i>Fertilizante NPK</i>	8
3.1.4. <i>Fertilizante Remita</i>	9
3.1.5. <i>Generalidades de las microalgas</i>	9
3.1.6. <i>Genero Chlorella</i>	10
3.1.7. <i>Chlorella minutissima</i>	11
3.1.8. <i>Cultivo de microalgas</i>	12
3.1.9. <i>Crecimiento de las microalgas</i>	12
3.1.10. <i>Curva de crecimiento</i>	13
3.1.11. <i>Utilización de la biomasa</i>	14
3.2. Antecedentes.....	15
4. Materiales y Métodos.....	18

4.1. Área de Estudio.....	18
4.2. Preparación de Medio de Cultivo.....	19
4.3. Condición Inicial de Cultivo.....	20
4.3.1. <i>Densidad poblacional</i>	22
4.4. Cultivo Artesanal con NPK (15-15-15) y Remital.....	22
4.4.1. <i>Seguimiento del crecimiento poblacional del cultivo artesanal</i>	23
4.4.2. <i>Tasa de crecimiento</i>	23
4.4.3. <i>Tiempo de duplicación</i>	24
4.5. Prueba Bacteriológica.....	24
4.6. Análisis de Datos.....	24
5. Análisis de Resultados.....	26
5.1. Densidad Poblacional.....	26
5.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación.....	29
5.3. Prueba Bacteriológica.....	31
6. Discusión.....	32
7. Conclusión.....	38
8. Recomendaciones.....	39
9. Bibliografía.....	40
10. Anexo.....	49

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Composición química para los medios de cultivo Medio F/2 (Guillard, 1978).....</i>	19
Tabla 2. <i>Densidades poblacional de C. minutissima (células/mL) cada 48 horas en un periodo de 576 horas ± representa la desviación estándar.....</i>	27
Tabla 3. <i>Tasa de crecimiento (K) y Tiempo de duplicación o división celular (TD) de ambos tratamientos, ± representa la desviación estándar.....</i>	29

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Chlorella minutissima</i> Fott & Nováková.....	12
Figura 2. Curva de crecimiento de microalgas en sistemas de cultivo (Sipaúba-Tavares y Rocha, 2003).....	13
Figura 3. Ubicación de los laboratorios del departamento de Biología, Universidad de Córdoba.....	18
Figura 4. Activación de la cepa <i>Chlorella minutissima</i> (Fott & Nováková, 1969) de medio sólido a líquido en un tubo de ensayo de 10mL.....	21
Figura 5. Cultivo de <i>Chlorella minutissima</i> (Fott & Nováková, 1969) con un volumen de 1.5l en frasco de 3L de capacidad.....	21
Figura 6. Hemocitómetro descrito por Pica, Ronco y Díaz, (2004).....	22
Figura 7. a) Empaque del fertilizante Remital; b) Empaque del gertilizante NPK T-15; c) Montaje del cultivo artesanal de <i>C. minutissima</i> (Fott & Nováková, 1969) en los medios de cultivo.....	23
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Chlorella minutissima</i> utilizando fertilizantes NPK y Remital como medios de cultivos.....	26
Figura 9. Distribución de la variable densidad en los tratamientos NPK y Remital en un periodo de 576 horas.....	28
Figura 10. Asociación de los niveles de densidad celular vs tratamientos....	29
Figura 11. Distribución de la variable Tasa de crecimiento (K) en ambos tratamientos durante las 576 horas.....	30

Figura 12. *Distribución de la variable Tiempo de duplicación (TD) en ambos tratamientos durante las 576 horas..... 31*

Índice de Anexos

Anexo 1. Referencia para la interpretación de hipótesis según el Factor de Bayes (FB).....	48
Anexo 2. Referencia de los valores del tamaño efecto para su interpretación (r)	49
Anexo 3. Histograma codificado por intervalos según la regla de Sturges....	50
Anexo 4. Datos de densidad celular para cada tratamiento con sus respectivas réplicas.....	51
Anexo 5. Estadística descriptiva de los datos obtenidos en las variables de densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, mediante gráficos visuales.....	52
Anexo 6. Prueba para contrastar la normalidad de los datos.....	54
Anexo 7. Resultado de la prueba bacteriológica.....	56

Resumen

El suministro de fertilizantes agrícolas como medios nutritivos, conllevan a un alto crecimiento de microalgas, reflejándose como fuente importante y eficiente para la producción de cultivos de estos organismos. Este estudio evaluó el crecimiento poblacional de *Chlorella minutissima* bajo la incidencia de fertilizantes agrícolas NPK y Remital; una primera fase se realizó en la Universidad de Córdoba y una segunda fase en un sector del barrio Mocarí, Montería-Córdoba. Inicialmente se requirió un inóculo, para esto se activó la cepa sólida en 10 mL de medio F/2 Guillard, luego se llevó a volúmenes de 350 mL y 1.5 L con este mismo medio en condiciones controladas. La segunda fase correspondió a la realización del sistema de cultivo artesanal donde se maximizó el volumen a 10 L usando fertilizantes agrícolas NPK y Remital por separados teniendo en cuenta 1 g/L de fertilizante, este se mantuvo en condiciones ambientales y aireación constante; se realizaron conteos cada 48 horas desde el inicio del cultivo hasta la fase estacionaria. Durante las primeras 96 horas no se presentó un aumento en el crecimiento de *C. minutissima* en ambos tratamientos, siendo esta la fase de adaptación, posteriormente se presentó el crecimiento exponencial del organismo, el cual inició las 144 horas; las unidades experimentales con NPK alcanzaron su fase estacionaria a las 432 horas con una densidad de 5680000 células/mL y las de Remital a las 384 horas con 3120000 células/mL. Se observó como resultado una curva tipo sigmoideal, característica de los cultivos discontinuos. Los tratamientos mostraron diferentes valores en ambas variables K y Td, sin embargo, el fertilizante NPK fue el tratamiento con menor tiempo de duplicación $5.85 \text{ div/día}^{-1}$ y mayor tasa de crecimiento 0.11 día^{-1} . Los dos tratamientos con los fertilizantes mostraron un crecimiento celular positivo de *C. minutissima* en un sistema de cultivo artesanal con volumen de 10 L, en condiciones de luz natural y temperatura ambiente, demostrando ser una buena opción como medios nutritivos. El tratamiento NPK presentó la mejor respuesta en cuanto a densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación. Por ello, NPK es el tratamiento más recomendado a la hora de producir biomasa microalgal, de los fertilizantes comerciales evaluados.

Palabras clave: Microalgas, fertilizantes, NPK, Remital, crecimiento poblacional, tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, densidad celular.

Abstract

The supply of agricultural fertilizers as nutrient media, lead to a high growth of microalgae, reflecting as an important and efficient source for the production of crops of these organisms. This study evaluated the population growth of *Chlorella minutissima* under the incidence of NPK and Remital agricultural fertilizers; a first phase was carried out at the University of Córdoba and a second phase in a sector of the Mocarí neighborhood, Montería-Córdoba. Initially an inoculum was required, for this the solid strain was activated in 10 mL of F/2 Guillard medium, then it was brought to volumes of 350 mL and 1.5 L with this same medium under controlled conditions. The second phase corresponded to the realization of the artisan cultivation system where the volume was maximized to 10 L using NPK and Remital agricultural fertilizers separately, taking into account 1 g/L of fertilizer, this was maintained under ambient conditions and constant aeration; counts were performed every 48 hours from the beginning of the culture until the stationary phase. During the first 96 hours there was no increase in the growth of *C. minutissima* in both treatments, this being the adaptation phase, later the exponential growth of the organism occurred, which began at 144 hours; the experimental units with NPK reached their stationary phase at 432 hours with a density of 5,680,000 cells/mL and those with Remital at 384 hours with 3,120,000 cells/mL. A sigmoidal type curve, characteristic of discontinuous cultures, was observed as a result. The treatments showed different values in both K and Td variables, however, the NPK fertilizer was the treatment with the shortest doubling time 5.85 div/day-1 and the highest growth rate 0.11 day-1. The two treatments with the fertilizers showed a positive cell growth of *C. minutissima* in an artisan culture system with a volume of 10 L, under conditions of natural light and room temperature, proving to be a good option as nutritive media. The NPK treatment presented the best response in terms of density, growth rate and doubling time. Therefore, NPK is the most recommended treatment when it comes to producing microalgal biomass, of the commercial fertilizers evaluated.

Keywords: Microalgae, NPK fertilizers - Remital, population growth, growth rate, doubling time, cell density

Introducción

Las microalgas son organismos fotosintéticos, que pueden crecer de modo autotrófico o heterotrófico. En general son altamente eficientes en la fijación del CO₂ y utilización de la energía solar para producir biomasa, con una eficiencia hasta cuatro veces superior a la de las plantas terrestres (Cajamar, 2015) (Bux et al., 2016; Chowdhury et al., 2019). La absorción de nutrientes, especialmente a partir de las formas del nitrógeno y el fósforo es crítica para el crecimiento y reproducción de algas acuáticas (Moreno et al., 2012), por esto, para obtener un elevado crecimiento celular en las especies de microalgas, es de vital importancia suministrar los nutrientes en cantidades adecuadas (Galarza, 2019), ya que muchas veces se debe tener en cuenta que las concentraciones varían según la especie y el objetivo de estudio (Hernández et al., 2014). Las microalgas han sido estudiadas en las últimas décadas, poniendo en evidencia que son varios los factores que determinan su crecimiento, estos factores son de tipo ambiental como la luz, temperatura, pH, CO₂, nutrientes y factores biológicos como zooplancton, herbívoros y patógenos de algas (Lee, 2013).

En los últimos años se ha incrementado la utilización de grandes volúmenes de cultivos microalgales para fines energéticos, principalmente para la obtención de biodiesel, aunque también otros biocombustibles como bioetanol, biometano, biohidrógeno y generar calor y electricidad. Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan obtener productos de alto valor añadido con aplicaciones en la nutrición y salud humana, acuicultura, cosméticos y biofertilizantes. Además, las microalgas pueden ayudar, durante su crecimiento, a reducir las emisiones de CO₂ por biomitigación biológica e intervenir en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, son los fines energéticos los que más están contribuyendo al enorme desarrollo que están experimentando las microalgas (Santos et al., 2014).

Los escalamientos a volúmenes mayores, implica una alta demanda de reactivos de óptimo grado analítico y un consumo considerable de hombre-tiempo que conlleva la preparación de los medios nutritivos, los cuales son costosos si se

tienen que adquirir en grandes cantidades, lo que eleva los costos de producción de los cultivos de estos organismos (Silva, 2016). La preparación de los medios de cultivo a gran escala representa un 30-40% de los costos de operación, según Jad-Allah (2012).

Los sistemas de cultivo artesanal son un ejemplo claro cuando de hablar de sistemas viables se trata, dando como resultado una producción ambientalmente sostenible y económicamente factible, por esta razón, actualmente es de interés suministrar información sobre el comportamiento o respuesta ecofisiológica de las microalgas en este tipo de sistemas y su relación con los nutrientes limitantes para su crecimiento (Loaiza et al., 2007). Este tipo de estudios busca generar información acerca de cómo responden las microalgas, en este caso *Chlorella minutissima*, en condiciones de estrés mediante la implementación de cultivos artesanales, bajo los parámetros necesarios y algunos fertilizantes agrícolas. En este sentido, se debe entender que las investigaciones basadas en el crecimiento de microalgas implementando cultivos alternativos son un instrumento indispensable para el análisis de la productividad de dichos organismos, ya que, no sólo proporcionan una base para el mejoramiento de procesos biológicos y tecnológicos, sino que facilitan la exploración de diversas condiciones ambientales y de funcionamiento biológico (Gómez, 2007).

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el crecimiento de *C. minutissima* en dos fertilizantes agrícolas, NPK (T-15) y Remital, con el propósito de evidenciar la respuesta del organismo bajo un sistema artesanal, aportando así información biológica y ecológica útil a los sistemas de producción. Cabe resaltar que, esta investigación hace parte de un megaproyecto de extensión que tiene por nombre: "Programa para la Implementación de Producción Artesanal de *Chlorella minutissima* (fott & nováková, 1969) como Alternativa Alimentaria para Poblaciones Vulnerables del Sector de Mocarí, Montería-Córdoba".

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar el crecimiento de *Chlorella minutissima*, en dos medios de cultivos en un sistema artesanal.

2.2. Objetivo Específicos

- Estimar la densidad celular de *Chlorella minutissima* Fott & Nováková, en fertilizantes agrícolas NPK (T-15) y Remital.
- Determinar la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Chlorella minutissima* expuesta a fertilizantes NPK (T-15) Y Remital.
- Apreciar el grado de sanidad en los dos cultivos.

3. Marco Teórico

3.1. Estado del arte

3.1.1. Fertilizantes agrícolas

Los fertilizantes agrícolas proveen a las cosechas de los nutrientes que necesitan, sobre todo los tres elementos químicos esenciales para las plantas (fertilizante NPK: nitrógeno, fósforo y potasio), aunque muchos fertilizantes también contienen micronutrientes como el hierro, cobre, zinc. De hecho, cada vez están ganando más importancia los micronutrientes, demostrando que son esenciales para un buen estado de las plantas (Belén, 2019). Con el uso de fertilizantes se evitan las deficiencias de nutrientes en las plantas, mejora su estado de salud y, por lo tanto, aumenta la cantidad y la calidad de los alimentos. Además, estos agroquímicos mejoran la fertilidad de los suelos y contribuyen al desarrollo de plantas más fuertes y sanas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

3.1.2. Tipos de Fertilizantes

3.1.2.1. Fertilizantes orgánicos. Los fertilizantes orgánicos, también llamados abonos orgánicos, son sustancias elaboradas a partir de la mezcla de distintos elementos orgánicos que están siendo desechados. Estos pueden ser de origen animal o vegetal, restos de distintas actividades, ya sean domésticas (desechos de vegetales, carnes, papeles, entre otros), agropecuarias (estiércol) o agrícolas (paja, rastrojos de los cultivos), y se obtienen a partir de la degradación de estos elementos, constituyendo de este modo los fertilizantes naturales (Rotoplas Agro, 2021).

3.1.2.2. Fertilizantes inorgánicos. Los fertilizantes inorgánicos o también llamados fertilizantes sintéticos son fabricados artificialmente, vienen con una dosis de macronutrientes exactos y están diseñados para atender necesidades específicas de los cultivos. Además, estos fertilizantes proporcionan nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) directamente al suelo (Nuttall, 2021).

3.1.3. Fertilizante NPK

El abono o fertilizante NPK como su propio nombre indica es un abono o fertilizante que está formado por los tres elementos o macroelementos primarios, nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K); dentro de todo el abanico de fertilizantes que hay disponibles, los fertilizantes NPK son los más completos nutricionalmente hablando, ya que aporta al cultivo o planta en el mismo momento de aplicación estos tres macronutrientes, la fórmula más conocida y más equilibrada del NPK es el T-15 (Tarazona, 2019).

3.1.4. Fertilizante Remital

Es un fertilizante granular tradicional de alta calidad, especialmente diseñado como aporte de la mayoría de los elementos requeridos para el óptimo crecimiento y desarrollo de los cultivos. Proporciona nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, boro y zinc, por lo que es especialmente recomendado para cultivos de café, palma de aceite, banano, plátano y frutales (Coacosta, 2021).

3.1.5. Generalidades de las microalgas

El término microalgas define a organismos microscópicos, con clorofila a, que realizan fotosíntesis oxigénica, incluyen tanto a microorganismos eucariotas como a procariotas (cianobacterias) distribuidas por todos los hábitats acuáticos. Pueden ser autótrofos o heterótrofos. En general son altamente eficientes en la fijación del CO₂ y producir biomasa a partir de la energía solar. La importancia de estos fotosintetizadores radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, convirtiéndose en los primeros productores de materia orgánica (Cajamar, 2015) y por ser potencialmente fuentes de proteínas, ácidos grasos, vitaminas, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos (Bellinger et al., 2010).

Estos organismos conocidos como productores primarios son de gran importancia tanto en ambientes acuáticos como terrestres. La cantidad de microalgas en los diferentes ambientes acuáticos determina la cantidad de peces y crustáceos (principalmente) que se estarían alimentando de estos recursos energéticos. Por ende, una disminución en la diversidad y abundancia de estos organismos se encuentra directamente relacionada con un descenso en

la población de organismos acuáticos vertebrados e invertebrados (Abdel et al., 2012).

3.1.6. Género *Chlorella*

Chlorella es un género de microalga verde acuática que forma parte del filo Chlorophyta, son organismos simples, no móviles. Estas fueron una de las primeras algas que se aislaron como un cultivo puro en 1980 por Martinus Beijerinck. Esta microalga se ha utilizado en estudios de fotosíntesis y respiración, además mucho del conocimiento generado sobre la síntesis de carbohidratos en microalgas ha sido obtenido por los estudios de las especies de este género (Ramazanov et al., 2006).

Las microalgas del género *Chlorella*, se caracterizan por tener forma elíptica o esférica, poseen un ciclo de vida simple. El modo de reproducción de estos organismos eucariotas es por la vía asexual en donde cada célula madre madura produce de 4 a 8 esporas. La división celular se lleva a cabo durante la noche y el incremento en el volumen celular en el día, dependiendo estos ciclos de las intensidades de luz y a las temperaturas a las cuales la microalga esté expuesta. Debido a varias de sus capacidades en su desarrollo y nutrición, presenta la capacidad de crecer en presencia y ausencia de luz (Garza et al., 2010).

Desde hace algunas décadas, se ha puesto atención al gran potencial de cultivo masivo de las especies de este género para la producción de alto valor y bajo volumen de compuestos, tales como pigmentos para la industria alimentaria, incluido el mercado de la salud en países industrializados y para la aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Muñoz y Guieysse, 2006). Se cree que hasta el momento, el genoma de *Chlorella* es el más pequeño para un microorganismo eucariota de características fotosintéticas (Bashan et al., 2008).

3.1.7. *Chlorella minutissima*

Chlorella minutissima es un alga unicelular que tiene clorofila a y b, y sintetiza almidón, como las plantas vasculares, estas microalgas tienen forma esférica y

carecen de flagelos (Rodríguez et al., 2016) (Figura 1). El crecimiento de *C. minutissima* no requiere la presencia de carotenoides secundarios, tiamina y vitamina B12. El límite inferior de tolerancia al pH es 5,5 y el límite superior de temperatura de crecimiento es 32 °C. Además, tiene una tasa de crecimiento rápida y un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Bhatnagar et al., 2010). Cabe resaltar que las especies del género *Chlorella* tienen gran importancia a nivel económico y comercial debido a la facilidad en su cultivo (Yamamoto et al., 2004) y su alto valor nutricional (Moronta et al., 2006). *C. minutissima* pertenece al Phylum Chlorophyta.

PHYLUM: Chlorophyta

SUBPHYLUM: Chlorophytina

CLASE: Trebouxiophyceae

ORDEN: Chlorellales

FAMILIA: Chlorellaceae

GÉNERO: *Chlorella*

ESPECIE: *Chlorella minutissima* (Fott&Nováková, 1969).

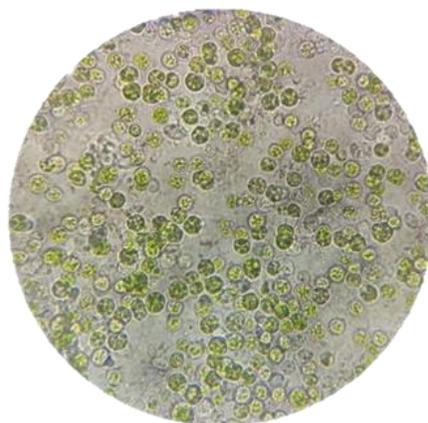


Figura 1. *Chlorella minutissima* (Fott&Nováková, 1969).

3.1.8. Cultivo de microalgas

Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancias de una microalga para todos o el mayor número de parámetros, tanto individuales como para el conjunto de todos ellos. En el cultivo masivo de microalgas el rendimiento alcanzado depende tanto de las concentraciones de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento (Cajamar, 2015). 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 como temperatura, pH, salinidad, luz y energía (Hernández et al., 2014).

3.1.9. Crecimiento de las microalgas

A medida que las células fitoplanctónicas llevan a cabo el proceso de la fotosíntesis, va aumentando su masa celular hasta el momento en que por bipartición una célula se divide en dos (López, 2015). La tasa de reproducción o crecimiento y la tasa de mortalidad definen el tamaño de cualquier población, incluyendo las fitoplanctónicas, sin embargo, la primera dependerá del tipo, la intensidad de luz, la transparencia, y la cantidad y disponibilidad de elementos esenciales para la fotosíntesis y el crecimiento (Melis, 2009).

3.1.10. Curva de crecimiento

Las curvas de crecimientos o fase de crecimiento presentan varias etapas (Figura 2), dependiendo de las características de cada especie de microalga y el estado de las cepa, las fases pueden alargarse o acortarse, criterio basado en la especie a estudiar (Arredondo et al., 2007; Singh et al., 2015).

Fase de retardo. Es muy corta, en esta la población crece muy poco debido a que es el periodo de aclimatación de los organismos al medio en el que se encuentra.

Fase exponencial. Las células se reproducen regularmente a una tasa constante hasta que la escasez de nutrientes o el exceso de desechos de los organismos reduce la tasa de crecimiento (es el momento donde hay mayor

densidad y valor nutricional); existe otra fase entre la exponencial y la estacionaria denominada fase de transición o reducción de crecimiento, donde disminuye la tasa de crecimiento.

Fase estacionaria. La población se mantiene relativamente constante, con períodos alternados de pequeños crecimientos y disminución de la población.

Fase descendente. Disminuye el tamaño de la población debido a que la tasa de mortalidad de las células es mayor a la tasa de reproducción.

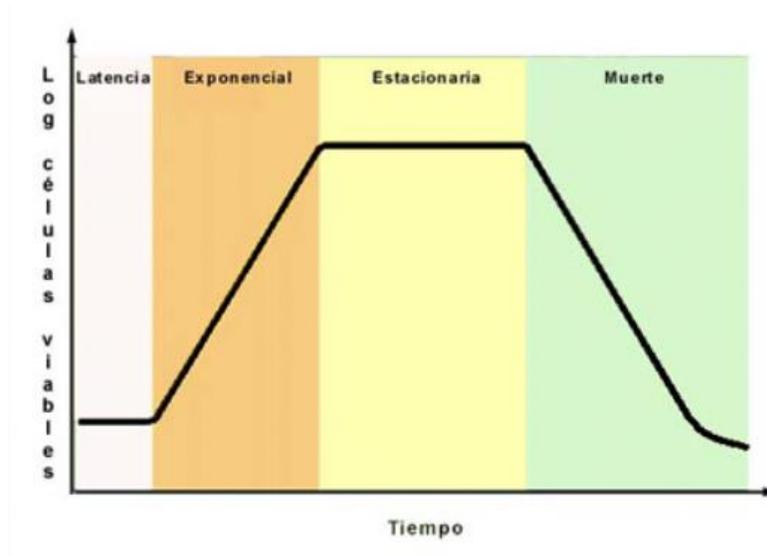


Figura 2. Curva de crecimiento de microalgas en sistemas de cultivo (Sipaúba-Tavares y Rocha, 2003).

3.1.11. Utilización de la biomasa

La biomasa algal tiene una amplia utilización que va desde biofertilizante a producción de biocombustibles, también para alimentación animal y humana, y para la obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética (Gómez, 2007). Los beneficios de los cultivos de microalgas pueden ser: a) el cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa; b) la composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición

del medio de cultivo; y c) bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros (Brennan et al., 2010).

3.2. Antecedentes

En los últimos años se han logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines. Hay constancia de aproximadamente 493 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre, animales y entre otras aplicaciones. El uso de microalgas está proporcionando a los científicos numerosas líneas de investigación y a los empresarios posibilidades de negocio, debido a la cantidad de aplicaciones que tienen. Uno de los aportes científicos en este ámbito del nuevo uso de las microalgas es el reportado por el investigador Ortiz et al. (2012), quien evaluó el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* (PHYLUM: Chlorophyta, SUBPHYLUM: Chlorophytina, CLASE: Trebouxiophyceae, ORDEN: Chlorellales, FAMILIA: Chlorellaceae, GÉNERO: *Chlorella*, ESPECIE: *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss, 1965),) *Chlorella* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas, donde el objetivo de este trabajo investigativo fue identificar el medio de cultivo que permitiera un máximo crecimiento de *C. sorokiniana* para su producción masiva; se estudiaron los medios de cultivo Sueoka, Guillard y Remital. Una de las conclusiones de este estudio arrojó que el Remital fue el mejor medio de cultivo y las condiciones autotróficas fueron ideales para el crecimiento de *C. sorokiniana*.

Los estudios basados en cultivo de microalgas son altamente importantes para un conocimiento biológico y ecológico más detallado de diferentes especies, siendo principalmente beneficiosos para la producción en entornos controlados donde los medios de cultivo proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de la especie (Mckim, 2006). Por tal razón, se han llevado a cabo investigaciones sobre el cultivo de especies de *Chlorella* para mejorar su crecimiento y producción aplicable en la industria y otros intereses. De forma general, se señalan trabajos como el de Muñoz et al. (2012), el cual consistió en evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico en *Chlorella vulgaris* (PHYLUM: Chlorophyta, SUBPHYLUM: Chlorophytina, CLASE: Trebouxiophyceae, ORDEN: Chlorellales, FAMILIA:

Chorellaceae, GÉNERO: *Chlorella*, ESPECIE: *Chlorella vulgaris* Beijerinck, M.W. 1890), utilizando volúmenes de 3 L, con luz y aireación constante. Como resultado la microalga alcanzó su mayor densidad con fertilizante complejo NPK en el día 22, seguido del humus de lombriz en el día 48, equinaza en el día 18, y por último con el chu10 en el día 12. Este estudio permitió concluir que los medios orgánicos son una buena opción para cultivar *C. vulgaris* y un mayor contenido proteico y que los fertilizantes agrícolas generan mayores densidades en los cultivos.

Silva (2016), en su estudio evaluó la productividad de la microalga verde *C. sorokiniana* con fertilizantes foliares usados en la agricultura y la comparación con el medio convencional Kolwitz (K3) como control. Se usaron dos fertilizantes comerciales como medios nutritivos con la composición química NPK T-20 y NPK 22-10-7 y se evaluó la ausencia y presencia de sulfato de magnesio en estos fertilizantes. El experimento se realizó en el Instituto de Estudios para los Ecosistemas, Florencia, Italia durante el año 2014. Como resultado se obtuvo que los medios provistos de sulfato de magnesio tuvieron efecto positivo en el crecimiento y rendimiento del cultivo; así como las cantidades de urea y amonio en la composición química del fertilizante.

Carmona (2018), realizó un estudio en diferentes laboratorios de la Universidad de Córdoba, el cual tuvo como objetivo general evaluar el crecimiento y potencial alimenticio de la microalga *C. minutissima* (Fott & Nováková, 1969) en dos medios de cultivo (Bold y F/2 Guillard). Realizó conteos celulares cada 48 horas para determinar el crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que los cultivos iniciaron con una densidad celular de 1×10^6 células/mL, obteniendo una densidad final para el medio Bold de 10.691.317 células/mL, un $K = 0,09 \text{ día}^{-1}$ y un $T_d = 6,99 \text{ div/día}^{-1}$, en F/2 Guillard la densidad celular alcanzada fue de 4.133.883 células/mL, un $K = 0,05 \text{ día}^{-1}$ y un $T_d = 11,62 \text{ div/día}^{-1}$.

González (2019), realizó un trabajo de investigación con el objetivo de evaluar la incidencia de distintas concentraciones de Clorpirifós sobre el crecimiento

poblacional y morfología de la especie *Chlorella minutissima*, con el fin de contribuir con información científica sobre los daños ecotoxicológicos derivados de los pesticidas y la búsqueda de estrategias sostenibles para su remoción eficiente. El medio de cultivo en el que se realizó el crecimiento de la microalga fue un medio Bold; las concentraciones de Clorpirifós no inhibieron significativamente el crecimiento poblacional de *C. minutissima* con respecto al control, excepto durante la fase exponencial.

El estudio reportado por Sánchez et al. (2019), tuvo como objetivo principal evaluar la influencia del rendimiento de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* bajo diferentes condiciones de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron 28 °C \pm 1 °C con un pH aproximado entre 6 y 7. La microalga *Chlorella vulgaris* fue cultivada a escala de laboratorio utilizando seis Erlenmeyer de 250 mL siguiendo la metodología descrita en el medio de cultivo Watanabe modificado. Se destaca que con la ayuda de la microscopía fue posible determinar la velocidad de crecimiento de la microalga en estudio con una duración de diez días, al cual esta se le suministraba aire y vitamina. Se obtuvo que a los cinco días los cultivos con vitaminas mostraron 8 veces mayor rendimiento, mientras que sin vitaminas un menor rendimiento. El mayor incremento se registró para el cultivo con vitaminas y suministro permanente de aire, el cual incrementó su producción de biomasa 20 veces.

4. Materiales y Métodos

4.1. Área de Estudio

La primera fase de este estudio de investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de la Universidad de Córdoba, localizado en la ciudad de Montería, en el departamento de Córdoba, dichas coordenadas son $8^{\circ}47'15.71''N$ $75^{\circ}51'28.01''O$, y se encuentra a una altitud de 13 msnm, con precipitación anual de 1000 a 1500 mm, temperatura promedio anual de $28^{\circ}C$ y 83% de humedad relativa (Prieto et al., 2013) (Figura 3). La segunda fase se desarrolló en el Barrio Mocarí, Montería, Córdoba específicamente en la Fundación Casa o casita IMAT (Figura 3).

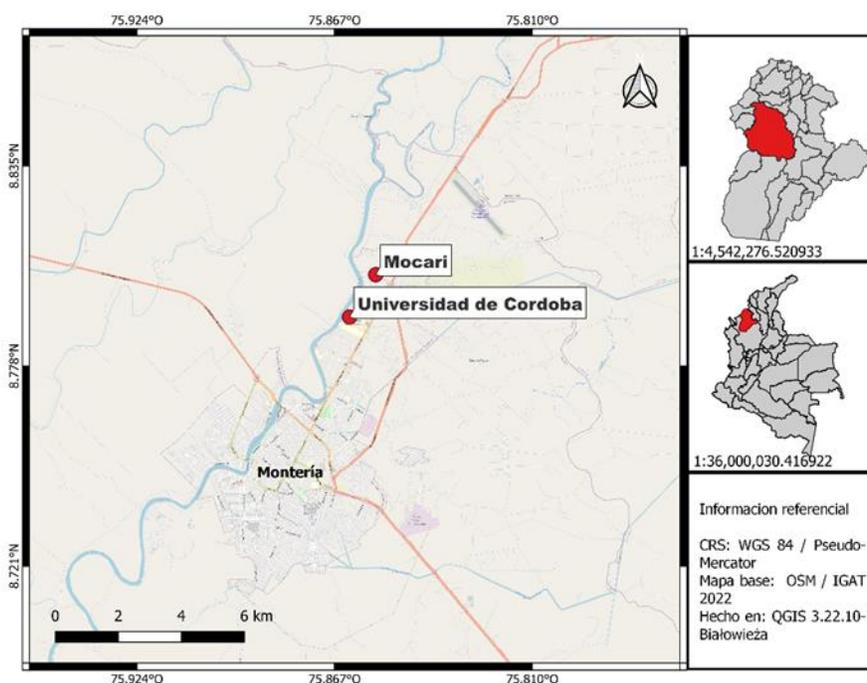


Figura 3. Ubicación de la Universidad de Córdoba y barrio Mocarí (Montería-Córdoba).

4.2. Preparación de Medios de Cultivos

El medio de cultivo Medio F/2 Guillard, se preparó bajo las indicaciones de Guillard (1978) con los nutrientes expuestos en la Tabla 1. Cabe resaltar que

antes de la preparación de este medio se realizó la esterilización de los materiales de vidriería, frascos, pipetas entre otros, utilizando la autoclave automática ALL AMERICAN, 121 °C en los tiempos correspondientes a su manejo.

Medio F/2 Guillard		
Nutrientes	Solución Primaria	Proporción
1. Nitrato de Sodio (NaNO ₂).	7.5 g/L	1 ml
2. Fosfato de Sodio (NaH ₂ PO ₄).	0.5 g/L	1 ml
3. Metales Traza:		
<ul style="list-style-type: none"> • Cloruro Férrico (FeCl₃) (3.15 g). • EDTA sal disódica (4.36 g). • Solución de Sulfato de Cúprico (CuSO₄) (0.19 g/50 ml). • Solución de Sulfato de Zinc (ZnSO₄) (1.10 g/50 ml). • Solución de Cobalto de Clorado (CoCl₂) (0.50 g/50 ml). • Solución de Cloruro de Manganeso (MnCl₂) (9 g/50ml). • Solución de Molibdato de Sodio (NaMoO₄) (0.31 g/50 ml). 	1 ml/L	1 ml/l

Tabla 1. Composición química para los medios de cultivo Medio F/2 (Guillard, 1978).

Al terminar el proceso de esterilización de los materiales, se adicionó a cada una de las soluciones los nutrientes necesarios para el cultivo (Tabla 1), en agua dulce previamente esterilizada en autoclave dentro de una cabina de flujo laminar.

4.3. Condición Inicial del Cultivo

La cepa fue suministrada por la empresa AGROIMSA de Guadalajara- México, el cual fue mantenida en condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C) pH (6.8 unidades de pH), luz estable por medio de luz blanca.

Para obtener grandes volúmenes de producción de *C. minutissima*, se requirió un inóculo, es por esto que inicialmente se realizó una primera fase en los laboratorios de la Universidad de Córdoba, bajo condiciones controladas de temperatura, pH, luz continua por medio de lámparas fluorescentes de luz blanca y agitación manual diaria. Se activó la cepa de medio sólido a medio líquido en tubos de ensayo de 10 mL donde se agregó 9 mL del medio de cultivo F/2 Guillard (Figura 4), adicionando la microalga por medio de un asa bacteriológica esterilizada; una vez se alcanzó la fase exponencial, se sembró un inóculo de 150 mL en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad, y en la fase exponencial se amplió a un volumen mayor (1.5 L) en frascos de 3 L de capacidad (Figura 5); teniendo este volumen y la fase exponencial, se hizo el conteo celular utilizando el método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro (Bright-line) descrito por Pica, Ronco y Díaz (2004), mediante la observación de dos alícuotas en el microscopio óptico (OLIMPUS) en aumento de 40x; en la realización del conteo se tuvo como referencia los cuadrantes de las esquinas con 16 cuadrículas internas cada uno, donde se siguió una secuencia por cada cuadrícula (Figura 6).



Figura 4. Activación de la cepa *C. minutissima* (Fott & Nováková, 1969) de medio sólido a líquido en un tubo de ensayo de 10 mL.



Figura 5. Cultivo de *C. minutissima* (Fott & Nováková, 1969) con un volumen de 1.5 L en frasco de 3 L de capacidad.

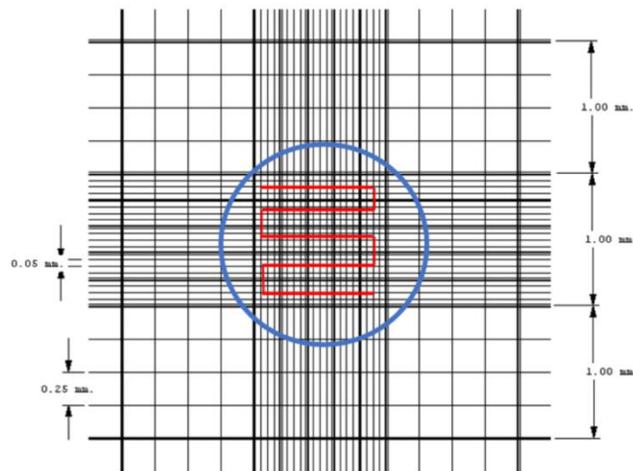


Figura 6. Representación esquemática del conteo en la cámara de Neubauer o hemocitómetro (Fuente modificada de Arredondo y Voltolina, 2007).

Este conteo se realizó con el fin de estimar la densidad poblacional

4.3.1. Densidad poblacional

Se halló la densidad poblacional mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células /ml} = (\text{Número de células en } 0.1\text{mm}^3) (10.000)$$

4.4. Cultivo Artesanal con NPK (T-15) y REMITAL

El inóculo bajo la cantidad necesaria fue sembrado y ampliado en un volumen mayor (10 L) en botellones con capacidad de 20 L, se prepararon los medios de cultivo por separado teniendo en cuenta como cantidad 1 g/L de NPK en un botellón y en el otro 1 g/L de Remital; con el medio preparado, se le agregó el inóculo. Los cultivos se mantuvieron en condiciones externas con luz natural y temperatura ambiente, además se les proporcionó aireación constante (24 °C - 33 °C) (Figura 7).



Figura 7. a) Empaque del fertilizante NPK T-15; b) Empaque del fertilizante Remital; c) Montaje del cultivo artesanal de *C. minutissima* (Fott & Nováková, 1969) en los medios de cultivo.

4.4.1. Seguimiento del crecimiento poblacional del cultivo artesanal.

Ambos cultivos fueron monitoreados mediante la utilización de recuentos celulares cada 48 horas, desde el inicio del cultivo hasta que se llegó a la fase estacionaria (240 h), utilizando el método de enumeración celular basado en el

uso de hemocitómetro (Bright-line) descrito por Pica, Ronco y Díaz (2004) mencionado en el proceso anterior, teniendo en cuenta las 16 cuadrículas en cada extremo (Figura 6).

4.4.2. Tasa de crecimiento.

Es el incremento en el número de células o en la masa celular por unidad de tiempo. La velocidad específica de crecimiento es característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo (sustrato).

$$K = \frac{(\ln \ln (NF) - \ln \ln (NO))}{t}$$

En donde,

Ln = Logaritmo natural.

NF = Número final de células en el tiempo.

No = Número inicial de células.

T = Tiempo en días.

4.4.3. Tiempo de duplicación.

Es el tiempo requerido para que a partir de una célula, se formen dos células, es decir, es el tiempo que tarda una población microbiana en duplicarse. Este tiempo varía considerablemente con los microorganismos y las condiciones ambientales como la temperatura.

$$td = \frac{\ln(2)}{k}$$

En donde,

Ln = logaritmo natural.

K = tasa instantánea de crecimiento poblacional.

4.5. Prueba Bacteriológica

Se realizó un análisis bacteriológico a los medios de cultivo con el fin de determinar la presencia de microorganismos en la muestra que pueden afectar la salud humana, para esto se llevaron muestras de medio de cada botellón a un laboratorio certificado presente en la Universidad de Córdoba y así se determinó el grado de sanidad de ambos bioensayos.

4.6. Análisis de los Datos

Las curvas de crecimiento poblacional se realizaron con un modelo de polinomio de 3°. Se realizaron pruebas de normalidad mediante el test de ShapiroWilk y prueba de homocedasticidad por medio de la prueba de Bartlett. Posteriormente, para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos NPK y Remital en la variable la densidad celular se utilizó la prueba de Mann-Whitney, aplicamos estadística Bayesiana (FB_{01}) (Anexo 1) y también se tuvo en cuenta el tamaño efecto (r) como apoyo para el p -Valor, los valores del tamaño efecto se interpretan teniendo en cuenta el anexo 2, asimismo se utilizó la prueba de Chi-Cuadrado para ver la existencia de las dependencias de las densidades en relación a los tratamientos, para esto se codificó la variable de densidad en intervalos (Anexo 3), bajo la regla de Sturges mostrados a continuación:

1e+06	muy baja
2e+06	baja
3e+06	ligeramente baja
4e+06	media
5e+06	ligeramente alta
6e+06	alta

Para tasa de crecimiento y tiempo de duplicación se aplicó la prueba t-welch y Factor de Bayes. Todo esto se realizó con una vía con nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, empleando el software estadístico R Project Versión 4.2.1©.

5. Resultados

5.1. Densidad Poblacional

El inóculo inicial de los tratamientos fue de 680.000 células/mL en promedio. Se realizó la evaluación durante 576 horas, obteniendo un número total de datos $n=26$ por cada tratamiento. Durante las primeras 96 horas se presentó una fase adaptativa en el crecimiento de *C. minutissima* en ambos medios (NPK y Remital), siendo esta la fase de adaptación, presentándose a continuación el crecimiento exponencial el cual inició las 144 horas; las unidades experimentales con NPK alcanzaron su máxima densidad a las 432 horas 5.680.000 células/mL y las de Remital a las 384 horas con 3.120.000 células/mL. En la Figura 8, se observa como resultado una curva tipo sigmoidea, característica de los cultivos discontinuos, se destaca que para el caso del tratamiento de NPK, se aprecia una tendencia en el cual la gráfica muestra de forma significativa que el modelo teórico propuesto se ajustan un 71% a los datos obtenidos en este trabajo por parte de este tratamiento ($R^2=0,71$) y para Remital un 54% ($R^2=0,54$).

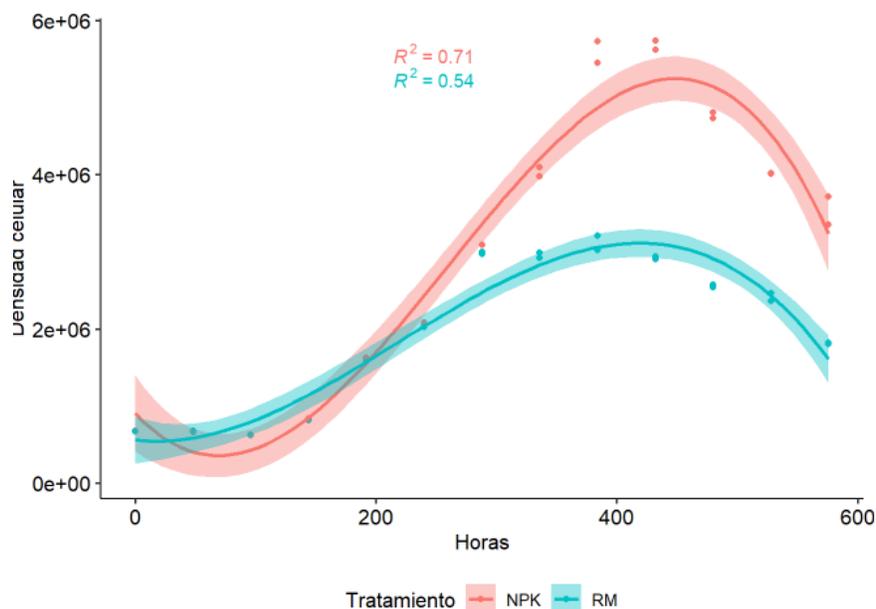


Figura 8. Curva de crecimiento de *Chlorella minutissima* utilizando fertilizantes NPK y Remital como medios de cultivos.

La mayor densidad celular se presentó en los tratamientos con NPK, alcanzando su máxima densidad a las 432 horas (5.680.000 células/mL) y un decrecimiento del cultivo a las 480 horas (4.770.000 células/mL). Para el caso de los tratamientos con Remital se alcanzó la máxima densidad a las 384 horas (3.120.000 células/mL) y un decrecimiento a las 432 horas, (2.920.000 células/mL) (Tabla 2), sin presentar diferencias significativas (Mann-whitney, p-Valor=0.05), mientras que el factor de bayes si arrojó diferencias entre los tratamientos ($FB_{01} = -0,77$); existe un tamaño efecto mediano de las diferencias de estos tratamientos ($r=0.31$), el cual indica la magnitud de la significancia y además que posiblemente un aumento en el tamaño de la muestra, repercutiría de forma significativa mostrando diferencias relevantes de las densidades de los tratamientos NPK y Remital (Tabla 2). Los datos obtenidos para cada una de las unidades experimentales se encuentran en el Anexo 4.

Tiempo Horas	Tratamientos	
	NPK (Cel/mL)	Remital (Cel/mL)
0	680000±0.71	670000±0.00
48	670000±0.00	670000±1.41
96	620000±0.71	620000±0.71
144	830000±1.41	810000±0.00
192	1620000±1.41	1570000±0.00
240	2060000±2.83	2020000±0.00
288	3040000±6.36	2980000±2.12
336	4040000±8.49	2960000±4.95
384	5590000±19.80	3120000±13.44
432	5680000±8.49	2920000±2.83
480	4770000±5.66	2560000±2.12
528	4020000±0.71	2410000±7.07
576	3540000±26.16	1810000±1.41

Tabla 2. Densidades poblacional de *C. minutissima* (células/mL) cada 48 horas en un periodo de 576 horas \pm representa la desviación estándar.

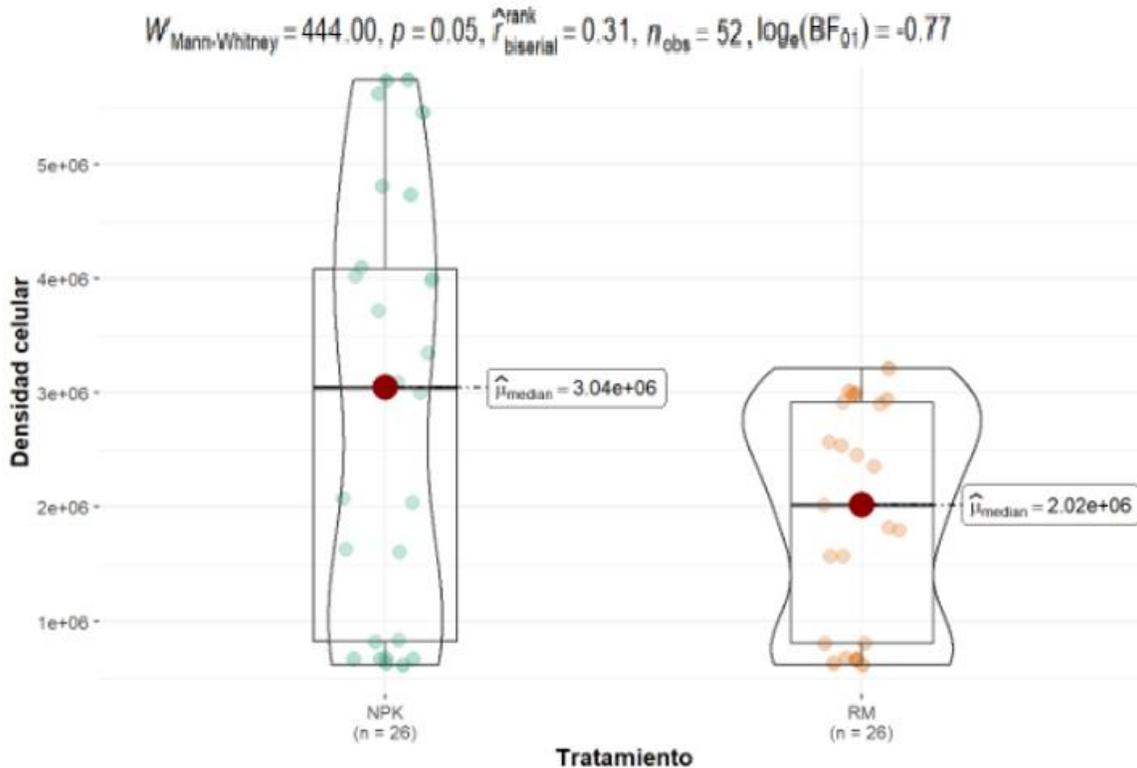


Figura 9. Distribución de la variable densidad en los tratamientos NPK y Remital en un periodo de 576 horas.

Al evaluar si existe una dependencia o asociación entre la densidad celular y los medios de cultivo, se evidenció relación significativa), lo que demuestra que la densidad celular depende del medio de cultivo (Figura 10), donde los valores de Remital están asociados a valores porcentuales de densidad ligeramente bajos (Chi-cuadrado, p-Valor=0.02), en contraste con los tratamiento NPK (Chi-cuadrado, p-Valor=0.03) con densidades ligeramente altas, ambos casos estadísticamente significativos.

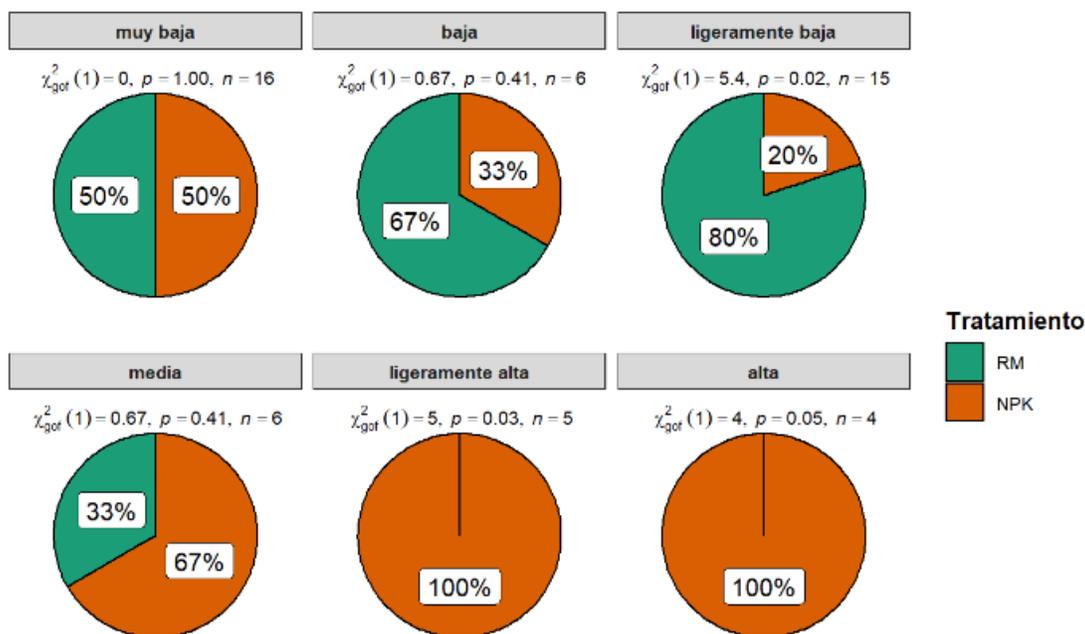


Figura 10. Asociación de los niveles de densidad celular vs tratamientos.

Tasa de crecimiento (K) y tiempo de duplicación (TD)

Para evidenciar los cambios específicos en la velocidad y la división celular es necesario evaluar los parámetros de crecimiento K y TD, ambos parámetros fueron estimados en los sistemas de cultivos y su respectiva desviación estándar tal como se muestra en la Tabla 3.

K (día⁻¹)	
NPK	Remital
0.11±0.00	0.09±0.00
Td (div/día⁻¹)	
5.85±0.01	7.22±0.20

Tabla 3. Tasa de crecimiento (K) y Tiempo de duplicación o división celular (TD) de ambos tratamientos, ± representa la desviación estándar.

Los tratamientos mostraron diferentes valores en ambas variables K y Td, donde el sistema de producción con el fertilizante NPK presentó menor tiempo de

duplicación y mayor tasa de crecimiento, sin presentarse diferencias significativas con respecto al P-valor, sin embargo el factor de Bayes si indica diferencias significativas al realizar el análisis estadístico (Figura 11 y 12). Valores de K (T-Welch, p-Valor= 0.05; $FB_{01} = -1.63$), y Td (T-Welch, p-Valor= 0.07; $FB_{01} = -1.44$).

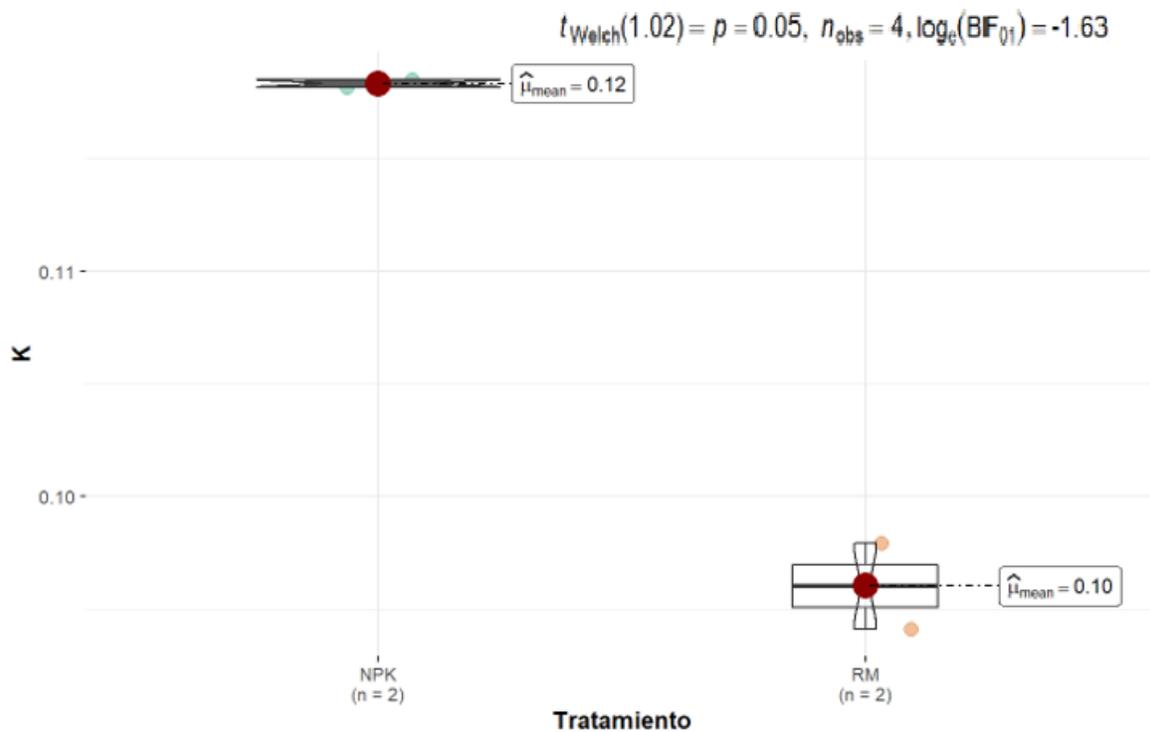


Figura 11. Distribución de la variable Tasa de crecimiento (K) en ambos tratamientos durante las 576 horas.

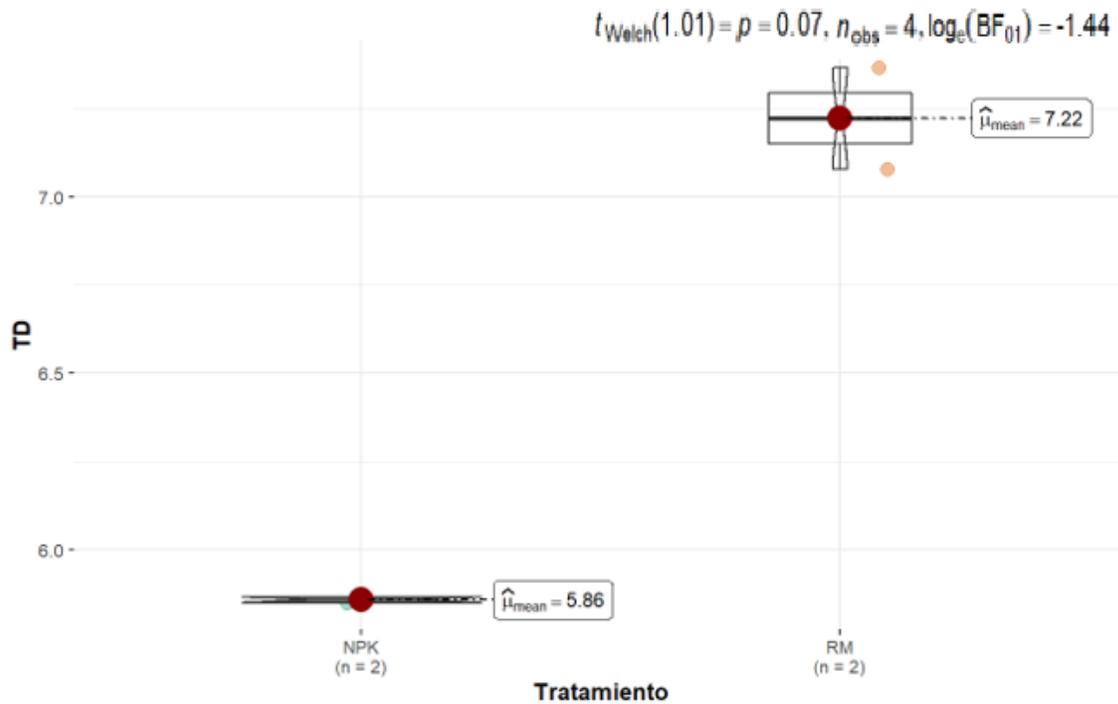


Figura 12. Distribución de la variable Tiempo de duplicación (TD) en ambos tratamientos durante las 576 horas.

Prueba Bacteriológica

De acuerdo a la normatividad manejada en el laboratorio de Sanidad Acuícola de la Universidad de Córdoba, los parámetros bacteriológicos tales como Coliformes fecales, *salmonella* y *Escherichia coli* que se le realizaron a ambos medios de cultivos, resultaron negativos. Lo cual indica que no presentaron agentes contaminantes como hongos y bacterias (Gram positivas y Gram negativas) ver anexo 7.

6. Discusión

Parámetros de crecimientos

El género *Chlorella* hace parte de las microalgas clorofíceas que tienen como característica un rápido crecimiento en cultivo celular y la capacidad de utilizar compuestos orgánicos e inorgánicos como sustrato nutricional (Chinnasamy et al., 2010; Wehr et al., 2003; Xu et al., 2006) Por esta razón, el género *Chlorella* abarca especies que han sido ampliamente estudiadas para incluirlas en procesos biotecnológicos, que generen productos orientados a las industrias alimenticias, farmacéuticas, agropecuarias, fuentes energéticas y en el tratamiento o eliminación de aguas residuales (Chisti, 2007). Los resultados de este trabajo amplían la información acerca de los efectos de los fertilizantes agrícolas sobre las microalgas, además, contribuyen a que la especie *Chlorella minutissima* puede tolerar la presencia de estos compuestos como medios. El fertilizante NPK tiene como componente 15% N (N amoniacal 8.89%- N nítrico 6.11%) 15% P y 15% K, por eso puede ser aplicado en condiciones de cultivos que requieran un alto aporte de nitrógeno, fósforo y potasio. En cuanto a los componentes del Remital presenta 17% N (N nítrico 7.3%- N amoniacal 9.7%), 6% P, 18% K, 2% Mg, 1.6% S, 0.2% B y 0.1% Zn es un fertilizante granular tradicional más completo, especialmente diseñado para el aporte de la mayoría de los elementos requeridos para el óptimo crecimiento y desarrollo de los cultivos; su fórmula es especialmente importante para utilizar en aquellas fases del crecimiento en donde la demanda de potasio y nitrógeno es alta, proporcionando además otros elementos esenciales que ayudan al desarrollo en los cultivos, pero presenta una importante desventaja al ser comparado con el fertilizante NPK, ya que contiene un bajo porcentaje de fósforo, recordando que este elemento es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía (Grobbelaar, 2004). Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento (Grobbelaar, 2004; Martínez 2008), siendo una de las posibles causas de las diferencias en el comportamiento de *C. minutissima* cultivada en estos dos fertilizantes.

Al comparar los resultados obtenidos con otros investigadores encontramos que la mayor densidad del tratamiento NPK en esta investigación se alcanzó a las 432 horas, estos resultados son semejantes a los reportados por Nayak et al., (2016) presentando su máxima densidad a las 408 horas usando el mismo fertilizante en la especie *Nannochloropsis sp.* Por otra parte estos resultados son diferentes a los obtenidos por Silva (2016), quien presentó su mayor densidad de *Chlorella sorokiniana* a 120 horas y las 144 horas pero con un valor de 3.5×10^6 cel/mL bajo el fertilizante NPK y presencia de sulfato de magnesio (1g/L), siendo que este fue realizado bajo condiciones controladas de intensidad lumínica y temperatura.

El medio de cultivo a base de Remital en este estudio alcanzó la mayor densidad a las 384 h, este resultado es muy semejante a los registrados por Ortiz et al. (2011), ya que alcanzó la máxima densidad a las 360 h utilizando este mismo fertilizante comercial con una concentración de 5.0 g/L ($0,75 \times 10^6$ cel/mL). Contrario a los resultados a los obtenidos por Burgos-Rada et al., (2016), dado que en su investigación este fertilizante produjo que la mayor densidad se alcanzara a las 288 h en una especie de *Desmodemus* ($2,9 \times 10^6$ cel/mL), donde la radiación de luz fue controlada a una temperatura promedio de 25 °C, indicando que los factores ambientales tienen un efecto significativo en la biomasa de microalgas; las condiciones ambientales, como la temperatura, la radiación de luz y el valor del pH causan diversos comportamientos sobre la producción de biomasa de diferentes especies de microalgas (Li et al., 2011).

Inicialmente en las primeras 96 horas, se evidenció una fase de adaptación en el crecimiento de *C. minutissima* utilizando los fertilizantes evaluados (Figura 8), resultados diferentes a los reportados por Londoño (2021), ya que en su investigación desde las primeras 24 horas se presentó una fase exponencial, lo cual indicó un crecimiento significativo en los diferentes tratamientos evaluados a distintas concentraciones, lo que sugiere emplear fertilizantes agrícolas como medio de cultivo para el crecimiento celular de algunas microalgas.

El fertilizante NPK mostró un mayor crecimiento celular (5680000 células/mL) en comparación con el fertilizante Remital (3120000 células/mL). Estos

resultados son comparables con los publicados de Kaippilliparambil et al. (2021), donde registraron mayor crecimiento celular de *Desmodesmus sp* en el tratamientos con fertilizantes NPK, en comparación con el medio tradicional BBM.

Numerosos investigadores han recomendado al fertilizante NPK como uso nutricional en la producción de microalgas, debido a su composición de nutrientes bien definida, por su solubilidad y por su disponibilidad, lo que lo hace una fuente nutricional muy semejante o inclusive mayor que los medios comerciales (Sipauba-Tavares et al., 2017). Cabe resaltar que al aumentar la concentración de este fertilizante mejora la producción de biomasa, hasta que se alcanza una concentración que afecta al crecimiento de estas microalgas. Esto corresponde a que los fertilizantes NPK tienen un porcentaje importante de nitrógeno ureico, incluido en el nitrógeno total, el cual es necesario para procesos metabólicos que realizan las microalgas en la fijación de nitrógeno donde se produce amonio (Miriam et al., 2017). La mayoría de los medios de cultivo convencionales tienen nitrato como única fuente de nitrógeno, mientras que el medio a base de fertilizantes que se propone está compuesto por nitrato y amonio, lo que podría explicar la buena asimilación de todos estos nutrientes por parte de la microalga. Por otra parte, las altas concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio que poseen los fertilizantes inorgánicos hacen que puedan ser utilizados como fuente alternativa en la formulación de medios para el cultivo de microalgas, certificando mejoras en el rendimiento (NABRIS, 2012); cabe resaltar que las microalgas pueden utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, pero a altas concentraciones inhibe la formación de adenosín trifosfato (ATP) en los cloroplastos (Miriam et al., 2017), lo cual afecta la actividad fotosintética, reduciendo la tasa de replicación celular en del medio. Al mismo tiempo, otros estudios mostraron que la asimilación de nitrógeno en *Chlorella* está fuertemente relacionada con la concentración y la fuente de fosfato, así como con la relación N/P que puede influir en el metabolismo de lípidos y proteínas en esta cepa de microalgas (Wu et al., 2013)

En este estudio el parámetro de tiempo de duplicación (T_d) presentó valores de $5.866 \text{ div/día}^{-1}$ para el fertilizante NPK (T-15) y para el fertilizante Remital $7.078 \text{ div/día}^{-1}$, estos reportes son diferentes a los obtenidos por Vélez et al., (2016) quienes mostraron en su investigación tiempos de duplicación menores para los diferentes tratamientos evaluados utilizando fertilizantes agrícolas; las condiciones del laboratorio estaban controladas en dos especies de microalgas, donde el máximo tiempo de duplicación fue de $(2.50 \text{ div/día}^{-1})$ para el fertilizante Complefol quien a su vez también registró una menor tasa de crecimiento (0.46 día^{-1}) . Todos estos resultados difieren con investigaciones que hicieron sistemas de cultivos en condiciones controladas porque al tratarse de cultivos controlados, se presenta poca variabilidad o cambios abruptos en los parámetros que influyen en el crecimiento de las microalga. Bartra (2019) menciona que al igual que como cualquier otro organismo vivo los cambios en las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de la microalga. Cada especie presenta un intervalo particular de temperatura, intensidad de luz, salinidad, aireación, homogeneización y proporción de nutrientes definida para un buen rendimiento o producción de estos organismos, razón por la cual muchos investigadores buscan generar las condiciones óptimas y estables para así generar ganancias y no pérdidas en los cultivos, la mayoría de estos son implementados en laboratorios siendo este el sitio perfecto para manipular dichas condiciones.

En cuanto a los valores de la tasa de crecimiento (K) obtenidos en este trabajo son semejantes a los hallados por Guayara (2019) quien reportó diferentes valores de tasa de crecimiento, siendo uno de ellos $0,153 \text{ día}^{-1}$ al aire libre en la especie *Nannochloropsis sp* en NPK. Al compararlos nuevamente con lo reportado por Londoño, (2021) se evidencia que obtuvo valores diferentes de tasa de crecimiento en los diferentes fertilizantes NPK, presentando menor tasa de crecimiento $(0,24 \text{ día}^{-1})$ para el tratamiento A (Florilizer) y mayor tasa de crecimiento $(0,68 \text{ día}^{-1})$ para el tratamiento D (Crecilizer) usando fotobiorreactores de 20L elaborados en acrílico transparente con temperatura ambiente y con burbujeo de aire enriquecido con CO_2 en cultivo de *Scenedesmus obliquus*. Estas diferencias se ven influenciadas por el suplemento de CO_2 , ya sea suministrado directamente o mezclado con la aireación, dado que este aumenta

enormemente la productividad de los cultivos masivos de microalgas. Esto actúa como fuente de carbono para la fotosíntesis y ayuda a mantener el pH de los cultivos (Laing et al., 1990), además el cultivo se mantuvo en temperatura ambiente mucho más bajas (18 - 28 °C). Estas temperaturas son diferentes a las registradas en esta investigación, ya que oscilaban entre 24 °C y 33 °C. Ramírez (2019) afirma en su estudio que el rango óptimo para los cultivos de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 °C y 25 °C, debido a que las altas temperaturas interrumpen la regulación metabólica y las conlleva a una muerte celular.

Cabe mencionar que los parámetros de crecimiento también se ven afectados por la pérdida de biomasa algal según Michels et al. (2014), debido a que al someter los cultivos al aire libre a horas de oscuridad, la fotosíntesis ya no es posible y prevalece la respiración. Esto resulta en pérdidas de biomasa durante la noche ya que las células de microalgas metabolizan los carbohidratos con fines de mantenimiento y para la síntesis de proteínas y otros compuestos celulares.

En el presente trabajo se evidenció que el fertilizante Remital tiene baja solubilidad, condicionalmente, este tarda más en disolverse en el agua. Siendo una posible razón por que las mayores densidades obtenidas se asocian principalmente al fertilizante NPK, siendo este uno de los factor que retarda el crecimiento de *Chlorella minutissima* debido a que los compuestos nutritivos como el nitrógeno (17%), potasio (18%) y fósforo (6%) no se homogenizan al instante (Jacob-Lopes et al., 2015). Es importante tener en cuenta que son muchos los factores que intervienen en los cultivos microalgales entre esos la evaporación, ya que en áreas tropicales existe un importante problema de evaporación elevada, lo que aumenta la concentración de sales en el medio y hace necesaria la adición de suficiente agua para contrarrestar la pérdida, con los consiguientes problemas que esto supone. En las zonas tropicales dónde son frecuentes las lluvias, éstas provocan fuertes diluciones de los cultivos, pérdida de nutrientes e incluso de biomasa microalgal. Además de las pérdidas por evaporación, las condiciones climáticas también afectan a la temperatura del medio de cultivo. Cuando la humedad relativa del aire es alta y no hay viento, el medio puede llegar a alcanzar los 40 °C, temperatura letal para la mayoría de

las especies microalgales, es aconsejable que las áreas de cultivo de algas tengan una humedad media relativa inferior al 60% (Abalde, 1995). Por otra parte, al contrastar los resultados de K y Td con lo reportado por Carmona, (2018) quién sembró *Chlorella minutissima* en cultivos masivos en un medio tradicional (F/2 Guillard) presentó Td= 9,64 y un K= 0,07 en condiciones de laboratorio, esto sugiere que a la hora cultivar la especie *C. minutissima*, presenta mayor tasa de crecimiento y menor tiempo de duplicación en condiciones ambientales con fertilizantes agrícolas (NPK y Remital), en comparación al F/2 Guillard, ya que estos fertilizantes le proporcionan un fuente de nitrógeno con menos gasto energético para su asimilación y además *Chlorella* presenta la capacidad para adaptarse a los diferentes ambientes, medios y condiciones de cultivo. Según Bicudo et al., 2006 estas especies son consideradas de alta resistencia a los cambios suministrados, incluyendo la deficiencia de nutrientes, por eso está presente en todo tipo de ecosistemas acuáticos y la literatura reporta sus adaptaciones a diferentes condiciones ambientales.

7. Conclusión

Los dos tratamientos con los fertilizantes mostraron un crecimiento celular positivo de *C. minutissima* en un sistema de cultivo artesanal con volumen de 10L, en condiciones de luz natural y temperatura ambiente, demostrando ser efectivos como medio nutritivo.

El tratamiento NPK (T-15) presentó la mejor respuesta en cuanto a densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, superando al tratamiento Remital. Por ello, es el tratamiento más recomendado a la hora de producir biomasa microalgal, a base de los fertilizantes comerciales evaluados. Por otro lado, el uso de fertilizante agrícola reduce el costo de producción del medio de cultivo sin alterar la calidad de la biomasa microalgal comparado con el medio F/2 de Guillard y otros medios tradicionalmente usados. En cuanto a la sanidad de estos cultivos los resultados arrojaron que estos se encontraron exentos de bacterias y microorganismos que podrían afectar el cultivo.

A pesar de las condiciones ambientales de luz y las altas temperaturas de Montería-Córdoba (Barrio Mocari), se logró la producción de biomasa microalgal utilizando fertilizantes de uso agrícolas como medio de cultivo en un sistema artesanal al aire libre para *Chlorella minutissima*, por lo tanto cabe resaltar que estos sistemas enriquecidos por medios alternativos, presentan una fuente confiable y óptima para el desarrollo y producción de estos organismos, ya sea para fines alimenticios, tratamiento de aguas residuales, agropecuarios, farmacéuticos, fuentes energéticas y entre otras aplicaciones.

8. Recomendaciones

El aporte principal de este trabajo es brindar información acerca de la capacidad que tiene *Chlorella minutissima* de crecer bajo la incidencia de fertilizantes agrícolas, por lo tanto, se recomienda el uso del fertilizante NPK por su fácil solubilidad con respecto al Remital.

Se sugiere cultivar *C. minutissima* y otras especies del género en diferentes concentraciones más altas o bajas de fertilizantes para ampliar información de su comportamiento, además de esto, también se puede evaluar el contenido proteico, contenido de clorofila, actividades enzimáticas y contenido lipídico, bajo estas condiciones.

Para realizar los cultivos con éxito se recomienda tratar de llevar estos cultivos con una buena higiene si es para consumo humano principalmente o si es de interés mantener la cepa completamente aislada sin el crecimiento de otros microorganismos, que puedan contaminarlo.

9. Bibliografía

- Abalde, J., Cid, A. , Fidalgo Paredes, P., Torres, E., Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións. ISBN: 978-84-97497-69-5. DOI: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abdel, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-75. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Arredondo, B.O., Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: B. Arredondo, y D. Voltolina, editores, Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, CA, USA*, 1(1), 17-26.
- Bartra Reyna, S. A. (2019). [Tesis de pregrado]. Evaluación de la Remoción de Arsénico Utilizando la Microalga *Chlorella Vulgaris* en Aguas Superficiales del Río Uchusuma, Tacna-Perú. *Universidad privada de TACNA*. <http://hdl.handle.net/20.500.12969/1277>
- Bashan, L.E., Antoun H., Bashan Y. (2008). Involvement of indole- 3-acetic- acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal Phycology*, 44, 938–947.
- Belén, M^a. (2019). Qué son los fertilizantes y sus tipos. *EcologíaVerde*, Página web: <https://www.ecologiaverde.com/que-son-los-fertilizantes-y-sus-tipos-1989.html>
- Bellingner, E., Sigee, D. (2010). Freshwater Algae (Identification and Use as Bioindicators). *Introduction to Freshwater Algae*, 1(1), 1–40. <http://doi.org/10.1002/9780470689554.ch1>
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., Das, K. (2010). *Chlorella minutissima*—a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1), 523-536. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8771-0>

- Bicudo, M., & Meneses, C. (2006). Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. *Rima São Carlos Brasil*: 2da ed.
- Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Bux, F., & Chisti, Y. (2016). Algae Biotechnology - Products and Processes. *Springer International Publishing*.
- Burgos-Rada, C. A., Ramírez-Merlano, J. A., Jiménez-Forero, J. A. (2016). Uso de fertilizante comercial en la cinética celular de *Desmodesmus opoliensis* (Chlorophyceae), reporte preliminar. *Orinoquia*, 20(2), 18-25.
- Cajamar, C., Palmerillas, L. (2015). ¿qué son las microalgas? interés y uso. *Cajamar ADN Agro*, 1-11. <https://www.cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf>
- Carmona, K. (2018). [tesis de pregrado]. Evaluación del crecimiento y potencial alimenticio de *Chlorella minutissima* (Fott & Nováková, 1969), en dos medios de cultivo. *Universidad de Córdoba*.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, RW., Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications, *Bioresource Technology*, 101(1), 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chowdhury, H., Loganathan, B., Mustary, I., Alam, F., & Mobin, S. (2019). Algae for biofuels: The third generation of feedstock. In Basile A. y Dalena F., (Eds), *Second and Third Generation of Feedstocks - The Evolution of Biofuels* (Chap 12, pp. 323-344). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00012-4>
- Coacosta. (2021). Productos de fertilizantes. *Coacosta un campo más productivo*. Página web: <https://www.coacosta.com/portfolio-item/remital-m/>

- Fott, B., Nováková, M. (1969). A monograph of the genus *Chlorella*. The freshwater species. *Studies in Phycology*. (Fott, B. Eds), 1(1), 10-74. Stuttgart: Schweizerbart'sche.
- Galarza, V. O. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
- Garza, M.T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredo, J. (2010). Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella* sp. Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*, 13(2), 174-177. <https://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=40212389009>
- Gigova, N.J. (2015). IVANOVA, Microalgae respond differently to nitrogen availability during culturing. *J. Biosci*, 40(1), 365–374.
- Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>
- González, C. (2019). [Tesis de pregrado]. Evaluación del crecimiento y la morfología de la microalga verde *Chlorella minutissima* (fott y nováková, 1969) expuesta al insecticida clorpirifós. *Universidad de Córdoba*.
- Grobbelaar, J. (2004). Algal nutrition: mineral nutrition. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 41(1), 97-115.
- Guayara Artunduaga, J. A. (2019). Producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores tubulares al aire libre utilizando fertilizantes como medio de cultivo. *Escuela de Biociencias*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76275>
- Hernández, P., Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(1), 157-173. <https://doi:10.4067/S0718-19572014000200001>.
- Jacob-Lopes, E., Queiroz, M.I., Ramírez-Mérida, L.G., and Zepka, L.Q. (2015). Microalgal Biorefineries. *Jacob-Lopes and Queiroz (ed.) Biomass Production and Uses*, Rijeka: InTech, 1(1), 81-106. <https://doi.org/10.5772/59969>.

- Jad-Allah, K. (2012). Development of cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. based on agricultural grade fertilizers available in the local market of Gaza Strip (Palestine). *J. Al Azhar University Gaza (Natural Sci)*, 14(1), 61-76.
- Kaippilliparambil, J., Aikkarakunnath, S., & Thajudeen, J. (2021). Cost effective cultivation and biomass production of green microalga *Desmodesmus subspicatus* mb. 23 in NPK fertilizer medium. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 599-604. <https://www.doi.org/10.15414/jmb fs.2019/20.9.3.599-604>
- Laing, I. & Ay ala, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En: *Introduction to Applied Phycology*. Akatsuka, I. (ed.), pp: 447-477. SPB Academic Publishing Bv, The Hague.
- Lee, J.W. (2013). Advance Biofuels and Bioproducts. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 1(1). <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-3348-4>.
- Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., Ruan, RR. (2011). Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*, 102(23), 10861-10867. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.064>
- Loaiza, N. R., Bermúdez, J., Moronta, R., Morales, E. (2007). Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 41-48. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690106>
- Londoño Lopera, J. M. (2021). [tesis de maestría]. Efecto de fertilizantes comerciales sobre la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* ATCC 11457 a escala piloto. *Universidad EAFIT*. <http://hdl.handle.net/10784/29933>
- López Sánchez., A. (2015). [tesis doctoral]. Evaluación de la comunidad fitoplanctónica de los grupos Diatomeas, *cyanophytas*, *chlorophytas* y dinoflagelados en las aguas del Río Estero Real, Chinandega y su relación

con la sanidad. *Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua UNAN-León*.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/4310>

- Martínez, L. (2008). [tesis doctoral]. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. *Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León*.
<https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ONMART%25CDNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 177(4), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.005>
- Mckim, Durnford. (2006). regulación traslacional de la expresión compleja de recolección de luz durante la aclimatación fotográfica a alta luz en *chlamydomonas reinhardtii*. *fisiología vegetal y bioquímica*, 44(1), 11-12, 857-865.
- Michels, M. H. A., Camacho-Rodríguez, J., Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. (2014). Effect of cooling in the night on the productivity and biochemical composition of *Tetraselmis suecica*. *Algal Research*, 6(1), 145–151. <https://doi:10.1016/j.algal.2014.11.002>
- Miriam, L. M., Raj, R. E., Kings, A. J., Visvanathan, M. A. (2017). Identification and characterization of a novel biodiesel producing halophilic *Aphanothece halophytica* and its growth and lipid optimization in various media. *Energy Conversion and Management*, 141(1), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.041>
- Moreno, A., Rojas, D., Bonilla, R. (2012). Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azospirillum brasilense* C16 mediante diseños estadísticos secuenciados. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 201-206. https://doi:10.21930/rcta.vol13_num2_art:256.
- Moronta, R., Mora, R., Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(1), 27-41.

- Muñoz, M., Ramírez, J., Otero, A., Medina, V., Cruz, P., Velasco, Y. (2012). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 438-449. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295024923012>
- Muñoz R., Guieysse B. (2006). Procesos de algas para el tratamiento de contaminantes peligrosos: *una revisión de una investigación sobre el agua*. 40(1), 2799 – 2815.
- Nabris, K.J.A. (2012). Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine). *Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences)*, 14), 61-76.
- Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M., Mohanty, R. C. (2016). Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(1), 7-13. <https://doi.org/10.2323/jgam.62.7>
- Nuttall, K. (2021). Tipos de fertilizantes inorgánicos. *Ehow en español*. Página web: https://www.ehowenespanol.com/tipos-fertilizantes-inorganicos-sobre_153140/
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., Otero, A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89625076002>.
- Prieto, M., Hernández, B., Gómez, R., Pardo, C., Atencio, V., Rosa, P. (2013). Efecto de tres tipos de presas vivas en la larvicultura de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*). *Revista MVZ Córdoba*, 18(3), 3790-3798. <https://doi.org/10.21897/rmvz.149>.
- Ramazanov, A., Ramazanov, Z. (2006). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycological Research*, 54(1), 255– 259. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00416.x>

- Ramírez, M. R. H. (2019). [Tesis de Maestría]. Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la remoción de nutrientes en agua de invernaderos. *Universidad Autónoma de Querétaro*. <http://ring.uaq.mx/handle/123456789/1276>
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Asian pacific phycology in the 21st Century: Prospects and challenges*, 512(1), 33-37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_5
- Rodríguez, G., Amarelo, C., Guerrero, M., Delgado dos Reis, A. (2016). Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Revista Tecnología en Marcha*, 29(4), 3-11. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i6.2897>
- Rotoplas, Agro. (2021). ¿Qué son y qué aportan los fertilizantes orgánicos a la agricultura?. *Rotoplas más y mejor agua*. Página web: <https://rotoplas.com.ar/agroindustria/que-son-y-que-aportan-los-fertilizantes-organicos-a-la-agricultura/>
- Sánchez, Y., Tobío, I., Romero, T., Díaz, Y., Melo, E., Piloto, R. (2019). Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. *Afinidad*, 76(585), 63-68. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/353445>
- Santos Montes, A. M., González Arechavala, Y., Martín Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Página web: https://www.iit.comillas.edu/documentacion/IIT-14-027A/Uso_y_aplicaciones_potenciales_de_las_microalgas.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). ¿Qué es y para qué sirve el fertilizante?. *Gobierno de México*. Página web: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/que-es-y-para-que-sirve-el-fertilizante>
- Shihira, I. & Krauss, R.W. (1965). *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. pp. 1-97. Maryland: University of Maryland, College Park

- Silva, A. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 265-275. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Singh, S., Singh., P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species. A review. *Renewable and Sustainable Energy reviews*, 50(1), 431-444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Sipaúba-Tavares, L. H., Segali, A. M. D. L. S., Berchielli-Morais, F. A., & Scardoeli-Truzzi, B. (2017). Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29(1), 5. <https://doi.org/10.1590%2Fs2179-975x3916>
- Sipauba-Tavares I.H. O. Rocha. (2003). Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de Organismos Aquáticos. *RiMa editora. São Carlos, Brasil*. 106 pp
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101(1), 87-96. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Tarazona. (2019). ¿qué es el abono NPK?. Productos agricultura Tarazona. Página web: <https://www.antoniotarazona.com/que-es-abono-npk/>
- Vélez, R. P. P., García, A. G. M., Zambrano, E. M. M., Chica, J. C. V. (2016). Crecimiento de las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* con fertilizantes agrícolas, en laboratorio. *La Técnica*, (16), 44-55.
- Wehr, J., Sheath, R. (2003). *Freshwater algae of North America: Ecology and classification, Aquatic Ecology Series, Academic Press, San Diego*. Elsevier.
- Wu, L. F., Chen, P. C., & Lee, C. M. (2013). The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85(1), 506-510. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.016
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters.

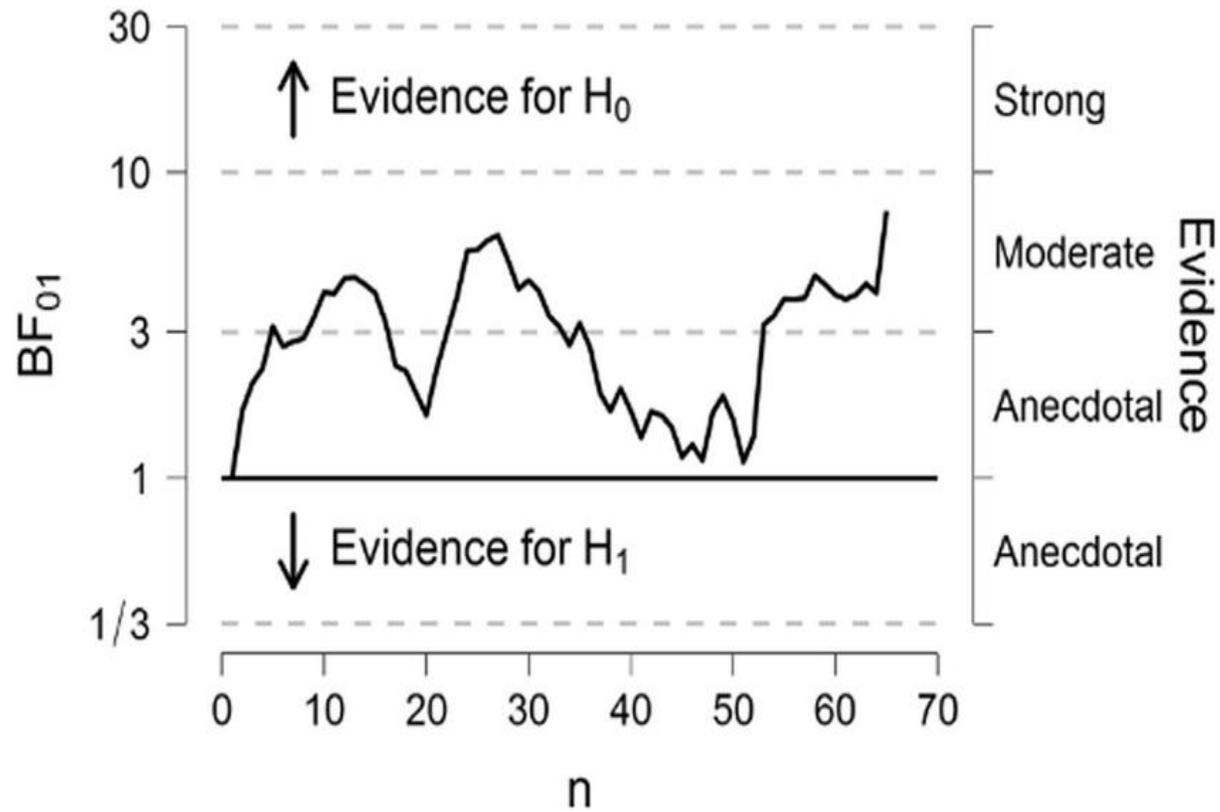
Journal of Biotechnology, 126(4), 499–507.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>

- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117(4), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0154-6>

10. Anexos

Anexo 1.

Referencia para la interpretación de hipótesis según el Factor de Bayes (FB).



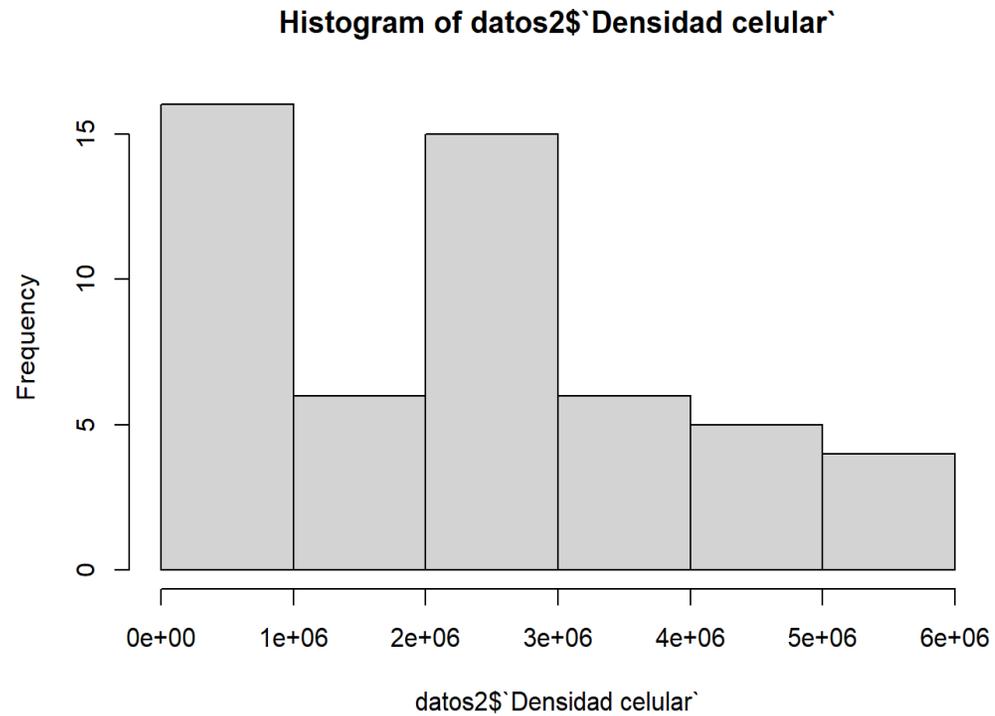
Anexo 2.

Referencia de los valores del tamaño efecto para su interpretación (r)

<i>Kind of Effect Size</i>	<i>Small</i>	<i>Medium</i>	<i>Large</i>
<i>r</i>	.10	.30	.50
<i>d</i>	0.20	0.50	0.80
η^2_p	.01	.06	.14
f^2	.02	.15	.35

Anexo 3.

Histograma codificado por intervalos según la regla de Sturges.



Anexo 4.

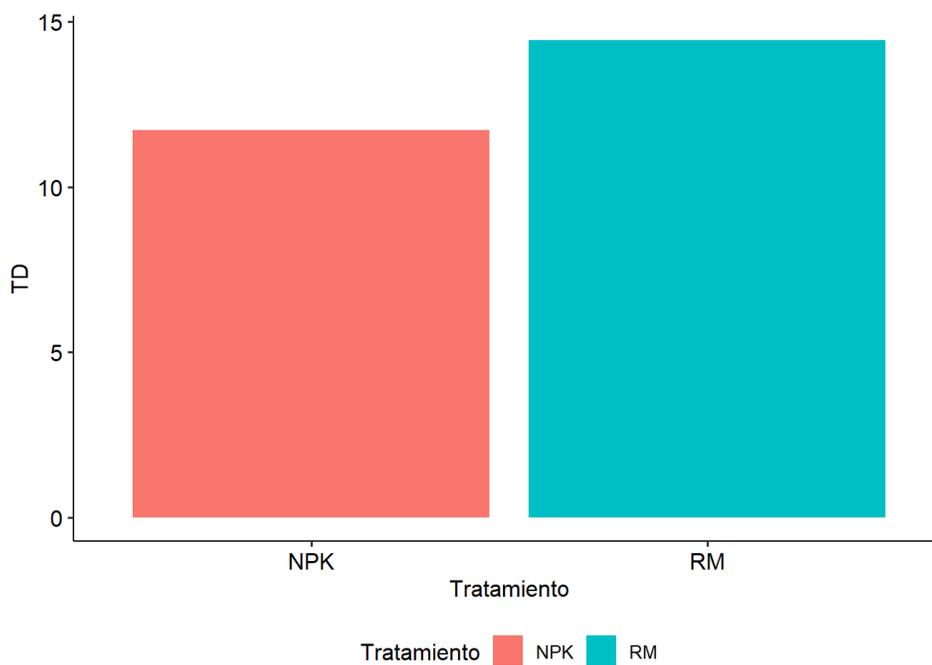
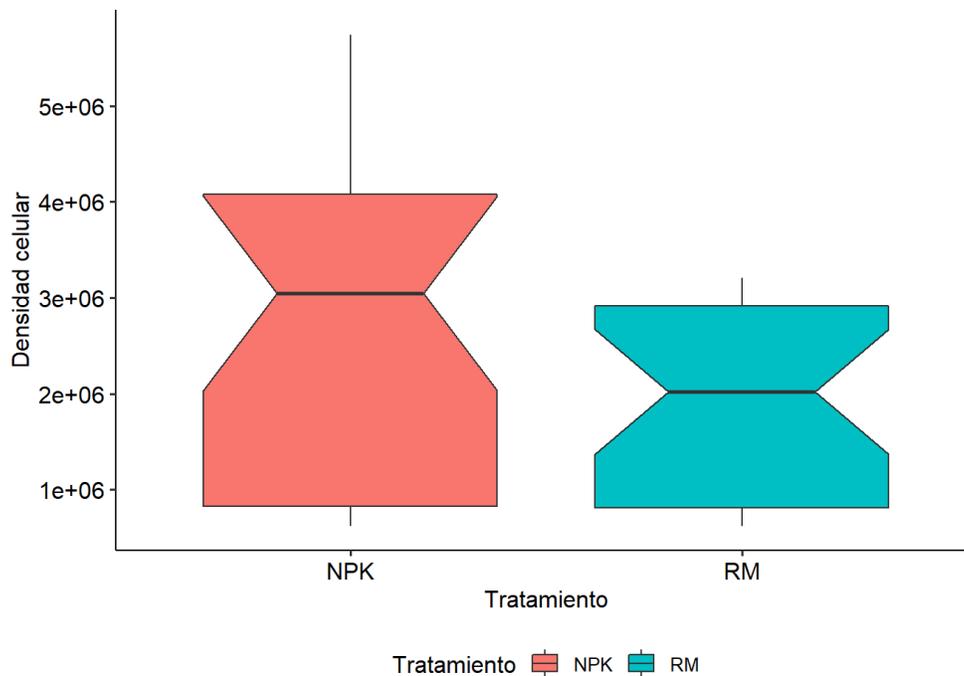
Datos de densidad celular para cada tratamiento con sus respectivas réplicas.

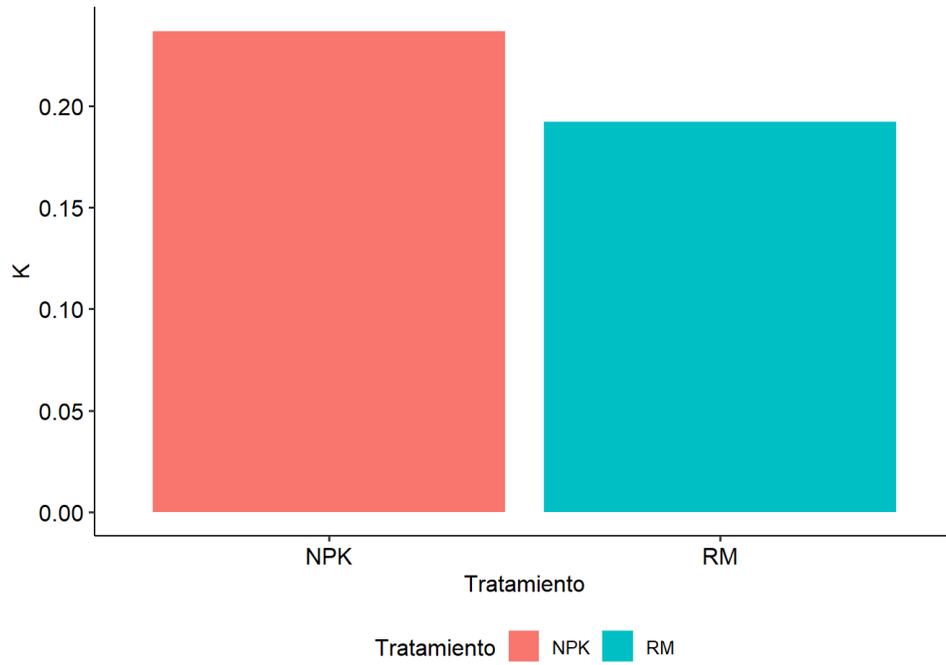
Densidad por días de los conteos celular NPK													
1	670000	670000	620000	820000	1610000	2040000	3000000	3980000	5450000	5620000	4810000	4020000	3720000
2	680000	670000	630000	840000	1630000	2080000	3090000	4100000	5730000	5740000	4730000	4010000	3350000

Densidad por día de los conteos Remital													
1	670000	680000	620000	810000	1570000	2020000	3000000	2990000	3210000	2940000	2570000	2460000	1820000
2	670000	660000	630000	810000	1570000	2020000	2970000	2920000	3020000	2900000	2540000	2360000	1800000

Anexo 5.

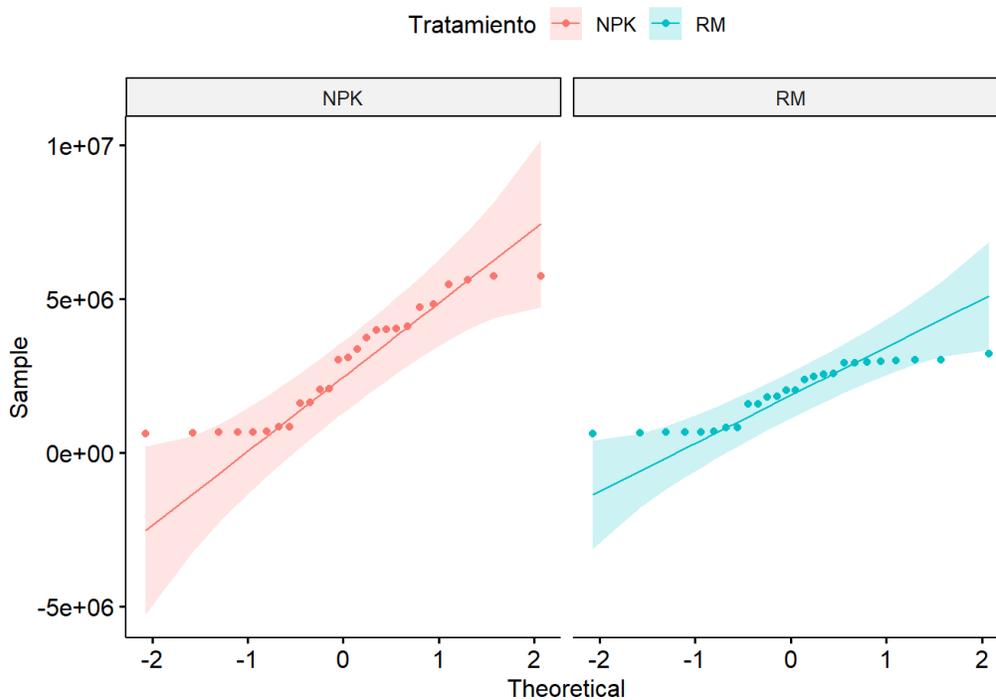
Estadística descriptiva de los datos obtenidos en las variables de densidad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, mediante gráficos visuales.





Anexo 6.

Prueba para contrastar la normalidad de los datos.



Supuesto	Test	Tratamiento	p.valor
Normalidad	Shapiro-Wilk	NPK	0.0087050
Normalidad	Shapiro-Wilk	RM	0.0025135

Bartlett test of homogeneity of variances

data: datos2\$`Densidad celular` and datos2\$Tratamiento

Bartlett's K-squared = 10.07, df = 1, p-value = 0.001507

variable	p.valor.Shapiro.Wilk
K	0.1061457
TD	0.1278970

Bartlett test of homogeneity of variances

data: tabla\$K and tabla1\$Tratamiento

Bartlett's K-squared = 2.2688, df = 1, p-value = 0.132

Bartlett test of homogeneity of variances

data: tabla\$TD and tabla1\$Tratamiento

Bartlett's K-squared = 2.8203, df = 1, p-value = 0.09308

Anexo 7. Resultado de la prueba bacteriológica.



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ACUICOLAS



Montería, 14 de septiembre de 2022

PARA: Martha Mogollón Arizmendi, Docente Dpto. de Biología

DE: Adriana Vallejo Isaza, Docente, Coordinadora del Laboratorio de Sanidad Acuícola

ASUNTO: Resultados calidad bacteriológica de cultivo de *Chlorella*.

Cordial saludo:

Mediante la presente, adjunto los resultados del análisis de calidad de agua solicitado

Estamos atentos a contribuir en los demás estudios que a bien tengan realizar.

Atentamente,


Adriana Vallejo Isaza
Coordinadora Laboratorio
Sanidad Acuícola

Por una universidad con calidad, moderna e incluyente
Carrera 6ª. No. 77-305 Montería NIT. 891080031-3 - Teléfono: 7860300 - 7860920
www.unicordoba.edu.co





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ACUICOLAS



INFORMACIÓN BÁSICA DEL SOLICITANTE			
Fecha solicitud:	10 /08 /2022	Documento de pago No:	N/A
Orden de servicio No:	002-2022	Valor pagado:	N/A
Solicitante:	Martha Mogollón Arizmendi	Céd /NIT:	
Empresa:	Universidad de Córdoba	Teléfono:	
Correo electrónico:		Vereda:	
Dirección:		Pais:	Colombia
Municipio:	Montería	Departamento:	Córdoba
Tipo de empresa:	Comercial () Promoción social () Educativa (X)		
Carácter:	Privado () Público (X) Mixto ()		
Registro ICA No:		Seccional:	
¿Desea recibir información sobre sanidad acuícola por su correo electrónico? (SI) (No)X			
¿Desea participar en programa de vigilancia epidemiológica de carácter científico? (SI) (No)X			

MUESTRAS DE AGUA

	Observación organoléptica del agua:		
	Medio + NPK	Medio + Remital	
Cultivo de Chlorella			
Muestra de agua (100 mL)			
Color del agua	Verde Claro	Verde Claro	
Turbidez	+	+	
Olor	No detectable	No detectable	

MÉTODOS DE ANÁLISIS:

Muestras de agua: Análisis cuantitativo de la calidad del agua en términos de coliformes totales y fecales en tubos de fermentación múltiple con caldo Brila (NMP.100mL⁻¹) (24h a 37°C + 24h a 44,5 +/- 0,5°C, confirmativa con EMB y reactivo de Kovacs).

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS:

Resultados: Calidad bacteriológica del agua de cultivo de Chlorella:

Agua del Cultivo (100 mL)	AGUA	
	Coliformes totales	Coliformes fecales
Medio + NPK (1 muestra)	28 x 10 ² NMP.100 mL ⁻¹	Negativo
Medio + Remital (1 muestra)	28 x 10 ² NMP.100 mL ⁻¹	Negativo
Estándar de bioseguridad para acuicultura: Coliformes fecales menor de 10x10 ⁴ NMP.100 mL ⁻¹ (WHO; 1989)		

Por una universidad con calidad, moderna e incluyente
 Carrera 6ª. No. 77-305 Montería NIT. 891080031-3 - Teléfono: 7860300 - 7860920
www.unicordoba.edu.co





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ACUICOLAS



DIAGNÓSTICO:

De acuerdo con la normativa (anexo) la calidad del agua de este estudio cumple con los estándares para productos de la pesca de productos crudos, congelados y ultracongelados; sin embargo, para una próxima ocasión se solicitará 5 muestras de cada tratamiento o punto de muestreo.

ANEXO: Ministerio de la Protección Social Resolución Número 776 De 2008

Tabla 7. Requisitos microbiológicos

PRODUCTOS DE LA PESCA, EN PARTICULAR PESCADOS, MOLUSCOS Y CRUSTÁCEOS FRESCOS				
ULTRACONGELADOS Y CONGELADOS CRUDOS				
PARÁMETROS	n	m	M	C
E. Coli	5	10	400	2
Recuento Estafilococo coagulasa positiva	5	100	1000	2
Salmonella /25g	5	NEGATIVO		0
Vibrio cholerae/25g	5	NEGATIVO		0
PRODUCTOS DE LA PESCA, EN PARTICULAR PESCADOS, MOLUSCOS Y MARISCOS PREGOCIDOS				
PARÁMETROS	n	m	M	C
E. Coli	5	10	100	2
Recuento Estafilococo coagulasa positiva	5	100	1000	2
Salmonella /25g	5	NEGATIVO		0
Vibrio cholerae/25g	5	NEGATIVO		0
PRODUCTOS DE LA PESCA, EN PARTICULAR PESCADOS, MOLUSCOS Y MARISCOS COCIDOS				
PARÁMETROS	n	m	M	C
E. Coli	5	MENOR 10		

RECOMENDACIONES:

- Mantener el control de calidad microbiológica del agua utilizada en el cultivo.

Adriana Vallejo Isaza
Adriana Vallejo Isaza
Coordinadora Laboratorio
Sanidad Acuicola

Por una universidad con calidad, moderna e incluyente
Carrera 6ª. No. 77-305 Montería NIT. 891080031-3 - Teléfono: 7860300 - 7860920
www.unicordoba.edu.co

