



Universidad Científica del Perú - UCP
Registrado en el Asiento N° A00010 de la Partida N° 11000310, Personas Jurídicas de Iquitos,
Superintendencia de los Registros Públicos - SUNARP

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA
AMBIENTAL

TESIS

**“ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE DESECACIÓN PARA
LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES MICROALGALES ÚTILES
PARA EXPLORACIÓN BIOTECNOLÓGICA”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AMBIENTAL**

AUTOR (es): Bach. Milagros Margarita TORRES VÁSQUEZ

ASESOR (es): Blga Marianela COBOS RUÍZ. Dra.

Lic. María Zadith CASUSO WONG.
MSc(c)

V.B. Marianela Cobos

San Juan Bautista – Maynas – Loreto – Perú 2021

V.B. María Casuso

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, trazarme el camino y con ello guiarme a las personas indicadas para estar en este momento.

A mi madre Luz Vásquez por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia que suponen el cimiento de mi desarrollo.

A todos y cada uno de ellos, por brindarme un soporte invaluable que servirán para toda mi vida.

Milagros Margarita Torres Vásquez

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Científica del Perú, por haberme aceptado ser parte de ella y abrirme las puertas a su seno científico y formarme como profesional.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitir el uso de sus equipos, materiales y reactivos, además de proporcionarnos las microalgas que fueron utilizadas en el proceso de experimentación.

A mi asesora, la Dra. Marianela Cobos Ruiz por depositar su confianza en mí, y brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis, su paciencia, y conocimiento que me brindó.

A mi asesora la Lic. María Zadith Casuso Wong, por su apoyo durante todo el proceso, y a mi amigo el Lic. Segundo Levi Estela Moreno, por todo el apoyo y confianza brindado durante el proceso de realización de la tesis en el laboratorio.

A ustedes mis más sinceros agradecimientos.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todos ellos MUCHAS GRACIAS.

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP

El presidente del Comité de Ética de la Universidad Científica del Perú - UCP

Hace constar que:

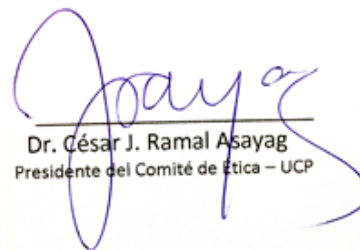
La Tesis titulada:

"ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE DESECACIÓN PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES MICROALGALES ÚTILES PARA EXPLORACIÓN BIOTECNOLÓGICA"

De los alumnos: **MILAGROS MARGARITA TORRES VÁSQUEZ**, de la Facultad de Ciencias e Ingeniería, pasó satisfactoriamente la revisión por el Software Antiplagio, con un porcentaje de **3% de plagio**.

Se expide la presente, a solicitud de la parte interesada para los fines que estime conveniente.

San Juan, 7 de abril del 2021.



Dr. César J. Ramal Asayag
Presidente del Comité de Ética – UCP

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Con Resolución Decanal N°581-2018-UCP-FCEI del 27 de setiembre de 2018, la FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP designa como Jurado Evaluador de la sustentación de tesis a los señores:

- | | |
|---|------------|
| • Ing. Carmen Patricia Cerdeña Del Águila, Dra. | Presidente |
| • MBlgo. Alvaro Benjamin Tresierra Ayala, Dr. | Miembro |
| • Blgo. Jorge Luís Marapara del Águila, Dr. | Miembro |

Como Asesoras: **Blga. Marianela Cobos Ruiz, Dra. y Lic.Ecol. María Zadith Casuso Wong.**

En la ciudad de Iquitos, siendo las 10:00 horas del día 14 de mayo del 2021, a través de la plataforma ZOOM supervisado en línea por la Secretaria Académica del programa Académico de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Científica del Perú., se constituyó el Jurado para escuchar la sustentación y defensa de la Tesis: **“Estandarización de un método de desecación para la conservación de especies microalgales útiles para exploración biotecnológica”**

Presentado por el sustentante: **MILAGROS MARGARITA TORRES VÁSQUEZ**

Como requisito para optar el título profesional de: **INGENIERO AMBIENTAL**

Luego de escuchar la sustentación y formuladas las preguntas las que fueron: **ABSUELTAS**
El Jurado después de la deliberación en privado llegó a la siguiente conclusión:

La sustentación es: **APROBADA POR UNANIMIDAD**

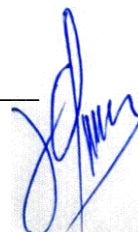
En fe de lo cual los miembros del Jurado firman el acta.



Miembro



Presidente



Miembro

APROBACIÓN
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



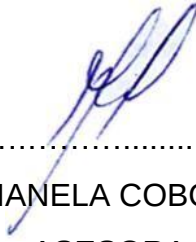
.....
Ing. CARMEN PATRICIA CERDEÑA DEL ÁGUILA Dra.
PRESIDENTE



.....
Mblgo. ÁLVARO BENJAMIN TRESIERRA AYALA Dr.
MIEMBRO



.....
Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.
MIEMBRO



.....
Blga. MARIANELA COBOS RUIZ Dra.
ASESORA



.....
LIC. MARÍA ZADITH CASUSO WONG M. Sc.(c)
ASESORA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN	iv
APROBACIÓN	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.1. Tipo y Diseño de investigación	3
2.2. Población y muestra	4
2.2.1. Población	4
2.2.2. Muestra	4
2.3. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	4
2.3.1. Técnica de recolección de datos	4
2.3.2. Instrumentos de recolección de datos	4
2.3.3. Proceso experimental	5
2.4. Procesamiento de análisis de datos	11
CAPÍTULO III	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1. Resultados	12
3.2. Discusión	26
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
3.1. Conclusiones	30
3.2. Recomendaciones	30
CAPÍTULO V: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	32
CAPÍTULO VI: ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Flujograma del procedimiento experimental para someter a las tres especies de microalgas a desecación	40
Perfil de crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp. después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A=15 días, B= 30 días y C= 60 días), hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.	13
Perfil de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A=15 días, B= 30 días y C= 60 días), hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.	16
Perfil de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. sometidas a después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A=15 días, B= 30 días y C= 60 días), hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.	19
Variaciones morfológicas antes y después de someter a las tres especies de microalgas a desecación a desecación (A = <i>Ankistrodesmus</i> sp, B = <i>Chlorella</i> sp y C = <i>Scenedesmus</i> sp)	23
Cultivos unialgales de tres especies de microalgas (A= <i>Chlorella</i> sp, B= <i>Ankistrodesmus</i> sp y C= <i>Scenedesmus</i> sp)	24
Cultivo y cosecha de las microalgas	48
Siembra por los métodos de desecación (A = Papel filtro, B = Silica gel, C = Arena Estéril y D = Matriz de Alginato de Sodio).	48
Ensayo experimental	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Características morfológicas de las especies de microalgas antes de someterlas a desecación	41
Variaciones morfológicas de las especies de microalgas después de someterlas a desecación	44

RESUMEN

La desecación es un método alternativo para la conservación de microorganismos, que consiste básicamente en la reducción del contenido de humedad utilizando técnicas que no deterioren su viabilidad; sin embargo, estudios sobre este método en microalgas son limitados, en su mayoría, dichas investigaciones están relacionados con los requerimientos para la conservación a largo plazo, y el almacenamiento del material algal contenidos en las colecciones de cultivo. La presente investigación comparó métodos adecuados para determinar la desecación de muestras y su aplicación en la conservación de cepas microalgales. Consecuentemente, el objetivo de la investigación fue evaluar los resultados de la conservación en tres tipos de cepas microalgales *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp mediante cuatro métodos de desecación por tres periodos de almacenamiento (15, 30 y 60 días). Para la conservación se utilizó como medio desecante papel filtro, silica gel, arena estéril y matriz de alginato de sodio. Luego, se evaluó el perfil de crecimiento y la viabilidad de los métodos mediante análisis espectrofotométrico, por un periodo de 60 días después de ser sometidas a desecación. *Ankistrodesmus* sp y *Chlorella* sp mostraron un mayor crecimiento celular y mayor estabilidad morfológica; en cambio, *Scenedesmus* sp tuvo menor crecimiento y mucha variabilidad. En cuanto a los desecantes, arena estéril y silica gel resultaron ser los más adecuados para la conservación de especies microalgales, en cambio, papel filtro y alginato de sodio no tuvieron los mismos resultados. En conclusión, la conservación por desecación es un método de gran utilidad que garantiza la viabilidad y disponibilidad células por largos periodos de tiempo para diversos estudios.

PALABRAS CLAVE: Conservación, crecimiento, desecación, desecante, estandarización.

ABSTRACT

Desiccation is an alternative method for the preservation of microorganisms, that basically consists in the reduction of moisture content using techniques that do not deteriorate their viability; however, studies on this method in microalgae are limited, mostly related to the requirements for long-term preservation and storage of algal material contained in culture collections. The present investigation compared suitable methods for determining sample desiccation and its application in the preservation of microalgal strains. Consequently, the objective of the research was to evaluate the results of preservation in three types of microalgal strains *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp and *Scenedesmus* sp through four desiccation methods for three storage periods (15, 30 and 60 days). For conservation, filter paper, silica gel, sterile sand and sodium alginate matrix were used as desiccant media. Then the growth profile and viability of the methods were evaluated by spectrophotometric analysis for a period of 60 days after being subjected to desiccation. *Ankistrodesmus* sp and *Chlorella* sp showed higher cell growth and greater morphological stability, while *Scenedesmus* sp had lower growth and high variability. As for desiccants, sterile sand and silica gel proved to be the most suitable for the preservation of microalgal species, while filter paper and sodium alginate did not have the same results. In conclusion, preservation by desiccation is a very useful method that guarantees the viability and availability of cells for long periods of time for various studies.

KEY WORDS: Conservation, growth, drying, desiccant, standardization

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo extremadamente diverso de organismos (principalmente) fotosintéticos (1). Estos microorganismos se pueden encontrar en casi todos los hábitats de la tierra, incluidos océanos, ríos, lagos, lagos de sal y tierra, y como simbioses en varios invertebrados (1, 2). Esta diversidad evolutiva se refleja aún más en la amplia variedad de compuestos producidos por las microalgas (3), que hacen que estos organismos sean atractivos para la bioprospección como nuevas fuentes de biomoléculas y para su aplicación en diversos procesos biotecnológicos (2, 4).

Dichos procesos constituyen una excelente alternativa para las extensas colecciones de cultivos microalgales, lo cual conlleva a establecer estrategias para su conservación *ex situ* mediante la creación de colecciones *in vivo*(5), para reducir así la degeneración y envejecimiento de las cepas, y con ello conservar adecuadamente y retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células (6).

Por tal motivo, es fundamental estandarizar métodos de conservación apropiados que garanticen su viabilidad por periodos prolongados de tiempo con todas sus características fisiológicas, bioquímicas y fenotípicas(7, 8), que permita aprovechar esta nueva tecnología y con ello captar y potenciar futuras investigaciones (8).

La revisión de la literatura sobre la amplia variedad de investigaciones sobre los métodos de mantenimiento y conservación de microalgas por largos períodos de tiempo señala que el uso de estos métodos depende de las posibilidades de cada laboratorio y del tiempo previsto; ya sean cortos, medianos o largos plazos (9, 10).

En el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, el método actual para mantener los cultivos axénicos microalgales, representa un gran gasto en reactivos, un rápido agotamiento de los nutrientes que los medios de cultivo proporcionan lo que conlleva a un mayor riesgo de contaminación por otros microorganismos, a este respecto se hace imperioso la necesidad de buscar métodos efectivos y confiables para el mantenimiento y preservación de las especies.

La criopreservación es uno de los métodos que nos ofrece una opción muy factible para el mantenimiento de especies microalgales a largo período de tiempo con gran estabilidad, sin embargo, en el laboratorio no se cuenta con equipos necesarios para este proceso, por tanto, evaluar los efectos de diversos protocolos sobre su posterior viabilidad de cada especie se torna fundamental, razón por la cual surge la necesidad de implementar un método de conservación a largo plazo que se ajuste a los recursos (equipos, reactivos y materiales) disponibles en el laboratorio (11).

Bajo las consideraciones anteriores; nos planteamos como alternativa, la desecación; con la finalidad de que las cepas microalgales, sean viables durante largos periodos de tiempo (12, 13); además, de frenar el metabolismo de los microorganismos con un mínimo de variación en sus características, protegiéndolas de alteraciones no favorables para sus propiedades morfológicas y metabólicas (8).

Así, el sentido final de esta tesis tuvo como objetivo principal el de establecer un método de desecación para la conservación de especies microalgales útiles para exploración biotecnológica, lo cual se obtuvo de los siguientes objetivos específicos: Establecer el perfil de crecimiento de las microalgas *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, a los 15, 30 y 60 días después de ser sometidas a desecación, Identificar morfología celular de las microalgas *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, antes y después de los 15, 30 y 60 días de ser sometidas a desecación y finalmente determinar el método de desecación apropiado para conservar microalgas.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y Diseño de investigación

La investigación fue descriptiva y exploratoria (Figura 1), ya que consistió en la evaluación de la variación morfológica, la viabilidad del método de conservación por desecación y el crecimiento óptimo o subóptimo en las especies *Ankistrodesmus* sp, *Scenedesmus* sp y *Chlorella* sp sometidas a procesos de desecación. Este proceso se hizo en relación con el tiempo de almacenamiento, el tipo de desecante o sustrato del método de desecación. Además de la identificación de las variables de mayor importancia que influyan al desarrollo de la investigación, sean resultados favorables o no, que puedan ayudar a obtener un mayor conocimiento sobre la conservación por desecación. El diseño de investigación fue experimental, el cual consistió en el cultivo de las cepas microalgales de interés *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, en medio cultivo BG-11, inicialmente en matraz Erlenmeyer de 100 mL y conforme fue incrementando, la biomasa microalgal se transfirió a frasco de mayor volumen, hasta obtener la saturación necesaria.

Una vez transcurrido seis semanas del cultivo de las cepas microalgales, se expuso la muestra a los ensayos correspondientes con los cuatro métodos de desecación, para evaluar la viabilidad, concentración y crecimiento en las cepas microalgales *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp al ser sometidas a cuatro tipos de desecantes: silica gel, papel filtro, arena estéril y matriz de alginato de sodio por tres tiempos de almacenamiento 15, 30 y 60 días. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se cosechó por centrifugación y se dispuso a realizar los ensayos experimentales. Cumplido el tiempo de almacenamiento de las muestras con los 15, 30 y 60 días correspondientes con el mes de abril (primer tiempo), abril – mayo (segundo tiempo) y abril – junio (tercer tiempo), se procedió a la activación de las cepas, de cada una de las concentraciones contenidas en las placas petri, se tomó 1 mL de biomasa y se depositó en tubos de ensayo de 5 mL, utilizando el medio específico para las cepas microalgales y de esta manera lograr evidenciar la viabilidad del método.

2.2. Población y Muestra:

2.2.1. Población.

Fue constituida por las especies microalgales dulceacuícolas de la Amazonía Peruana.

2.2.2. Muestra.

Estuvo representada por las especies microalgales (*Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp) que fueron proporcionadas por el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

2.3. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos

2.3.1. Técnica de recolección de datos

La técnica utilizada para la recolección de datos fue la observación directa, en la cual se tomó registro de los resultados sobre el perfil de crecimiento en cada una de las cepas al ser sometidas a desecación en tres tiempos siendo estos 15, 30 y 60 días, respectivamente; posteriormente se realizó análisis microscópicos, donde se identificaron las características morfológicas, de esta manera se pudo evaluar los siguientes aspectos del ensayo con las cepas cultivadas: viabilidad del método, efectividad del método, axenidad del cultivo.

2.3.2. Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron son los siguientes:

- a) Fichas o guías de observación. Se utilizaron para registrar las características morfológicas de las cepas microalgales, además de comparar la información obtenida de los perfiles de crecimiento por método de desecación con cada una de las microalgas.
- b) Registro de Microsoft Excel. Se utilizó para el registro de los datos.

- c) Análisis estadísticos. Se utilizó para determinar la viabilidad, homogeneidad, varianza y con ello revelar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.
- d) Los materiales diversos utilizados para el procesamiento de recolección de datos son: Frasco de vidrio con tapa rosca de diferentes volúmenes, matraces de vidrio de diferentes volúmenes (500 mL y 1000 mL), puntas de plásticos de 10, 200 y 1000 μ L, Micropipetas de volumen variado: 0.5 – 1.0, 20 – 200 μ L y 1000 μ L, pastillas magnéticas, microtubos de 200 μ L y 1,5 mL, tubos de vidrio de 5 mL, láminas cubreobjetos, papel lente, hilo pabilo, algodón y gasa estéril.
- e) Los equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron: Cabina de doble flujo laminar (Telstar, Technologies S.L), balanza analítica (Sartorius, ED 124S), autoclave (Yamato, SM 510), potenciómetro (HANNA, 2210), agitador magnético (Thermo Scientific), Destilador de Agua (GFL 2004), Estufa (Ecocell 550), Baño María (THOMOS), Microscopio de luz invertida (Leica DM1i), Espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific EE. UU), Centrifuga refrigerada (Hettich, Universal 320 R).

2.4. Procedimiento Experimental.

2.3.3.1. Obtención de las cepas microalgales:

Las cepas microalgales de interés fueron *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, las cuales fueron obtenidos del Banco de Cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

2.3.3.2. Cultivo de las cepas microalgales

El cultivo de las cepas se realizó en medio BG-11, contenidos en matraces a un volumen final de 80 mL, el cual contenía 50 mL de cultivo unialgal y 30 mL de medio; y conforme fue incrementando la concentración del cultivo microalgal se transfirió a frascos de mayor volumen hasta completar 1 L de cultivo y un crecimiento celular mayor a $1,6 \times 10^6$ células/mL, durante seis semanas hasta

observar suficiente biomasa microalgal para realizar los ensayos experimentales. Las condiciones de cultivo fueron con agitación a 110 rpm a 25° C con un fotoperíodo de (12:12) luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. m}^2. \text{s}^{-1}$ (4).

2.3.3.3. Cosecha de las cepas microalgales

La cosecha se realizó en 4 tubos falcón de 50 mL por centrifugación, a 4500 rpm, 20°C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió nuevamente más cultivo a los mismos tubos, bajo las mismas condiciones indicadas inicialmente. Estos pasos se repitieron hasta obtener toda la biomasa microalgal de 1L de cultivo. Luego, el precipitado microalgal de los 4 tubos fue transferido a un solo tubo; el cual se centrifugó por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se transfirió cada una de las concentraciones contenidas a placas petri, para realizar los ensayos para la conservación de las cepas microalgales de interés.

2.3.3.4. Evaluación del perfil de Crecimiento de las especies microalgales *Ankistrodesmus sp*, *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp*

El crecimiento microalgal de los cultivos concentrados evaluados se realizó cada tres días a la misma hora utilizando el espectrofotómetro UV/visible Nanodrop 2000 C descrito por Cobos *et al.* 2016 (4). Este procedimiento consistió en tomar una alícuota (3 μL) de la suspensión celular microalgal de cada cepa y se colocó en microtubo de 200 μL , seguidamente se realizó el conteo celular a través del software que controla el espectrofotómetro, se seleccionó la opción de lectura de conteo celular a 680 nm de absorbancia, luego se realizó la lectura del blanco (blanqueo) poniendo 3 μL de medio BG-11 en el sensor, y se procedió a realizar las lecturas de las alícuotas extraídas del cultivo microalgal, para así medir con precisión la reproducibilidad de los cultivos y verificar la pureza de cada una de las cepas (4).

2.3.3.5. Identificación de la morfología celular de las especies microalgales

***Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp**

Para las muestras de cultivo unialgal *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, se tomaron alícuotas de 10 μ L de los inóculos que estuvieron en experimentación, se colocaron esos 10 μ L en un portaobjetos sobre la platina del microscopio de luz invertida (Leica DM1i) donde se observaron a 40 x de aumento. Estas observaciones se realizaron según los siguientes criterios: tamaño, coloración, márgenes, etc (14). Posteriormente se realizaron fotografías para identificar sus características morfológicas y con ello se realizó una comparación por medio de referencias bibliográficas de las cepas observadas (2). Esta identificación se realizó antes y después del proceso de conservación por desecación. Los 3 μ L restantes se utilizaron para análisis espectrofotométrico a través de conteo directo en el equipo espectrofotómetro UV/ visible Nanodrop 2000C por 680 nm de absorbancia (4).

2.3.3.6. Determinación del método de desecación apropiado para la conservación de microalgas

La conservación de las cepas se realizó por el método de desecación y se emplearon cuatro agentes desecantes: papel filtro, silica gel, arena estéril y matriz de alginato de sodio (11), con el propósito de determinar cuál de estos métodos mostraba mejores resultados en el proceso de conservación. Adicionalmente, se utilizó el medio de cultivo BG-11 como medio nutritivo, ya que actualmente es recomendado como medio base, dado que permite el mejor crecimiento de las microalgas. Subsecuentemente luego de realizar la centrifugación de la biomasa microalgal, y haber sido descartado el sobrenadante, el precipitado se transfirió a placas petri, y se procedió a realizar los ensayos para la conservación de las cepas microalgales. Se realizaron 2 ensayos con el fin de observar la repetibilidad del método de desecación, el almacenamiento de las placas con biomasa microalgal desecada se realizó por tres tiempos de 15 días, 30 días y 60 días.

Las cepas microalgales conservadas fueron evaluadas teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- **Viabilidad:** Se determinó la viabilidad de la cepa microalgal si esta se recuperaba mediante el crecimiento formando colonias típicas en medio de cultivo.
- **Axenidad:** Se determinó el grado de pureza de la cepa microalgal cuando únicamente se recuperaba las colonias típicas del aislamiento evaluado.
- **Estabilidad Morfológica:** Se consideró que un aislamiento poseía estabilidad morfológica cuando la evaluación microscópica correspondía a las características previas a su mantenimiento.

A. Conservación por el método de desecación con discos de papel filtro

La conservación en discos de papel de filtro se realizó según la metodología modificada descrita por García y Uruburu, 2001 y modificada por Parra Huerta *et al*, 2006 (15), basada en la paralización del crecimiento celular por la eliminación del agua disponible para las células.

- 1) Se cortó los discos de papel filtro Whatman N° 4 en cuadros de 1 cm x 3 mm.
- 2) Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120° C.
- 3) El papel filtro absorbente y estéril fue secado en estufa, por 60 minutos.
- 4) Seguidamente, se llevó los cuadros a una placa petri estéril que contengan 2 mL de biomasa microalgal.
- 5) Posteriormente se dejó secar dentro de una cámara de doble flujo laminar durante 60 min.
- 6) Una vez secos los discos se colocaron en placas petri estériles.
- 7) Se conservó a temperatura ambiente en sobres de papel aluminio esterilizado (15 cm x 15 cm) y se aseguró el cerrado con parafilm.
- 8) Se rotuló las tapas con los siguientes criterios: Especie microalgal, tratamiento, fecha de inicio de la desecación, hora de la desecación, nombre de la persona que realiza la desecación; por un tiempo de almacenamiento de 15, 30 y 60 días.
- 9) Se almacenó en un cajón hermético.

B. Conservación por el método de desecación con silica gel

El método de desecación por silica gel fue adaptado y modificado a partir de Arrencibia *et al.*, 2008 (11), que consistió básicamente en:

- 1) Se esterilizó previamente el silica gel en estufa a 140° C por 4 horas.
- 2) Del concentrado se sustrajo una alícuota de 2 mL de biomasa microalgal y se llevó a placas petri estériles.
- 3) Se dejó secar dentro de una cámara de doble flujo laminar durante 60 min.
- 4) Se selló herméticamente en bolsas de papel aluminio el cual contuvo silica gel.
- 5) Se rotuló con los criterios previamente establecidos en el párrafo anterior por un período de 15, 30 y 60 días.
- 6) Fue almacenado a completa oscuridad y se almacenó en un cajón hermético a temperatura ambiente.

C. Conservación por el método de desecación con arena estéril

El método de conservación en arena estéril fue adaptado y modificado a partir de Gutiérrez *et al.*, 2017 (16), que consistió en:

- 1) Se esterilizó el sustrato en autoclave a 121° C x 25 min.
- 2) Se esterilizó en estufa a 140° C x 4 horas.
- 3) Del concentrado microalgal se sustrajo una alícuota de 2 mL y se colocó en 4 g del sustrato estéril dentro de una placa petri previamente esterilizada.
- 4) Se procedió a realizar un secado rápido a 50° C x 1 hora.
- 5) Se selló herméticamente con papel aluminio.
- 6) Se rotuló y almacenó en completa oscuridad a temperatura ambiente en una caja hermética por un período de 15, 30 y 60 días.

D. Conservación por el método de encapsulación –deshidratación en matriz de matriz de alginato de sodio.

Este método fue realizado por Fabre y Dereuddre para la conservación de cultivo *invitro* de células y órganos vegetales en 1990 (13) modificado por García – Águila, 2007 (18),

mediante una metodología de encapsulación - deshidratación que consistió básicamente en:

- 1) Se preparó una solución de alginato de sodio al 3% en agua destilada
- 2) Se homogenizó vigorosamente durante 45 minutos a 1200 rpm.
- 3) Se esterilizó por un periodo de 15 minutos a 121° C.
- 4) Se dejó en refrigeración entre 12 a 36 horas hasta eliminar burbujas.
- 5) En una cabina de flujo laminar se procedió a realizar una mezcla de alginato – microalgas, el cual se agitó hasta obtener una mezcla homogénea.
- 6) seguidamente se los dispuso en placas petri estériles y se agregó una solución al 2% de CaCl_2 para su gelificación durante aproximadamente 2 horas y media.
- 7) Las esferas fueron lavadas cinco veces en agua destilada para eliminar cualquier exceso de CaCl_2 .
- 8) Una vez encapsuladas las esferas se extrajeron y fueron pretratadas con sacarosa al 0,75 M; que actúa como crioprotector, por un periodo de 48 H.
- 9) Al tercer día, desde el pretratamiento con sacarosa, se procedió a la deshidratación de las esferas.
- 10) Se colocaron todas las esferas sobre una placa Petri con papel filtro estéril para facilitar su manipulación y se situaron en el fondo de la cabina de flujo laminar, y así utilizó el flujo de aire estéril como método de deshidratación, se mantuvo en esta posición una hora.
- 11) Se selló herméticamente con papel aluminio, se les rotuló y se almacenó en completa oscuridad temperatura ambiente en una caja hermética por un período de 15, 30 y 60 días.

2.3.3.7. Activación de las cepas microalgales conservadas

Una vez transcurrido el almacenamiento de las muestras con los 15, 30 y 60 días correspondientes con el mes de Abril (Primer tiempo), Abril – Mayo (Segundo Tiempo) y Abril – Junio (Tercer tiempo), se procedió a la activación de las cepas, de cada una de las concentraciones contenidas en las placas petri. El tratamiento de rehidratación se basó en resuspender 2 mL de la biomasa desecada con medio

de cultivo BG-11, siendo seguidamente lavado con solución salina (NaCl_2 al 9%), reduciendo así cualquier residuo del desecante por método utilizado. Para la rehidratación por el método de desecación por encapsulación en matriz de Alginato de sodio, se realizó el mismo proceso, sin embargo, para la disolución de las esferas de alginato, se preparó una solución de bicarbonato de sodio al 4 % p/v a temperatura ambiente, consecuentemente para acelerar la solubilidad de las esferas se homogenizó durante 20 minutos a 100 rpm.

Seguidamente se procedió a realizar la evaluación de los cultivos concentrados desecados, la identificación morfológica en un microscopio de luz invertida (Leica DM1i) y el análisis espectrofotométrico, utilizando el espectrofotómetro UV/ visible Nanodrop 2000 C descrito por (Cobos M, *et al.* 2014) (4), se realizó un conteo directo cada tres días a la misma hora. Este procedimiento ya descrito se realizó a cada muestra por triplicada de los métodos, se anotaron los datos en fichas de registro, se procedió a realizar su respectivo calculo en hojas de Excel, se calculó su correlación y se determinó la correspondiente ecuación de la recta (4).

2.4. Procesamiento de análisis de datos.

Los datos de las variables evaluadas en el crecimiento microalgal de los tres tipos de cepas microalgales, se procedió a realizar un análisis estadístico mediante pruebas de normalidad y homogeneidad. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey y correlación de Pearson, para revelar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

Los valores fueron presentados como promedio $\pm$ error estándar para cada variable evaluada. La base de datos será creada empleando el software Microsoft Excel® y el análisis estadístico fue realizado con el software estadístico R Studio 3.6.1. Todas las pruebas se realizarán a un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

3.1.1. Perfil de crecimiento de las microalgas *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, a los 15, 30 y 60 días después de ser sometidas a desecación

En la figura 2 (A, B y C) se describe los resultados del perfil de crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus* sp, luego de ser sometida a tres periodos de desecación (15, 30 y 60 días), con cuatro descantes diferentes, e inmediatamente de ser hidratadas y puestas a evaluación por 60 días, cuyo cultivo inicial partió de 0.539 de absorbancia a una densidad óptima (DO) de 680 nm.

En la figura 2 (A y B), se observa una fase de adaptación breve (tres días) de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp, desde los días 6 al día 9, después del primer día de ser sometido a evaluación. Además, en las figuras (2A, 2B y 2C) se observa que la especie cultivada y sometida a tres periodos de desecación presenta fluctuaciones en su crecimiento celular. Dicha fluctuación se manifiesta en gran medida con los ensayos realizados con arena estéril y matriz de alginato de sodio. Sin embargo, alginato de sodio presenta un crecimiento celular distinto respecto a los otros desecantes (silica gel y papel filtro) y grupo control, expresando de este modo una fase exponencial de crecimiento desde el primer día de evaluación.

Además, el desecante alginato de sodio evidencia un crecimiento distinto desde el primer día de evaluación de su crecimiento hasta el día quince, obteniendo una concentración de 2.289 ng/mL de absorbancia el día 9 del primer periodo de desecación (15 días) de la evaluación de 60 días (figura 2A), siendo el que exhibe una mayor densidad óptica promedio respecto a los periodos de 30 y 60 días.

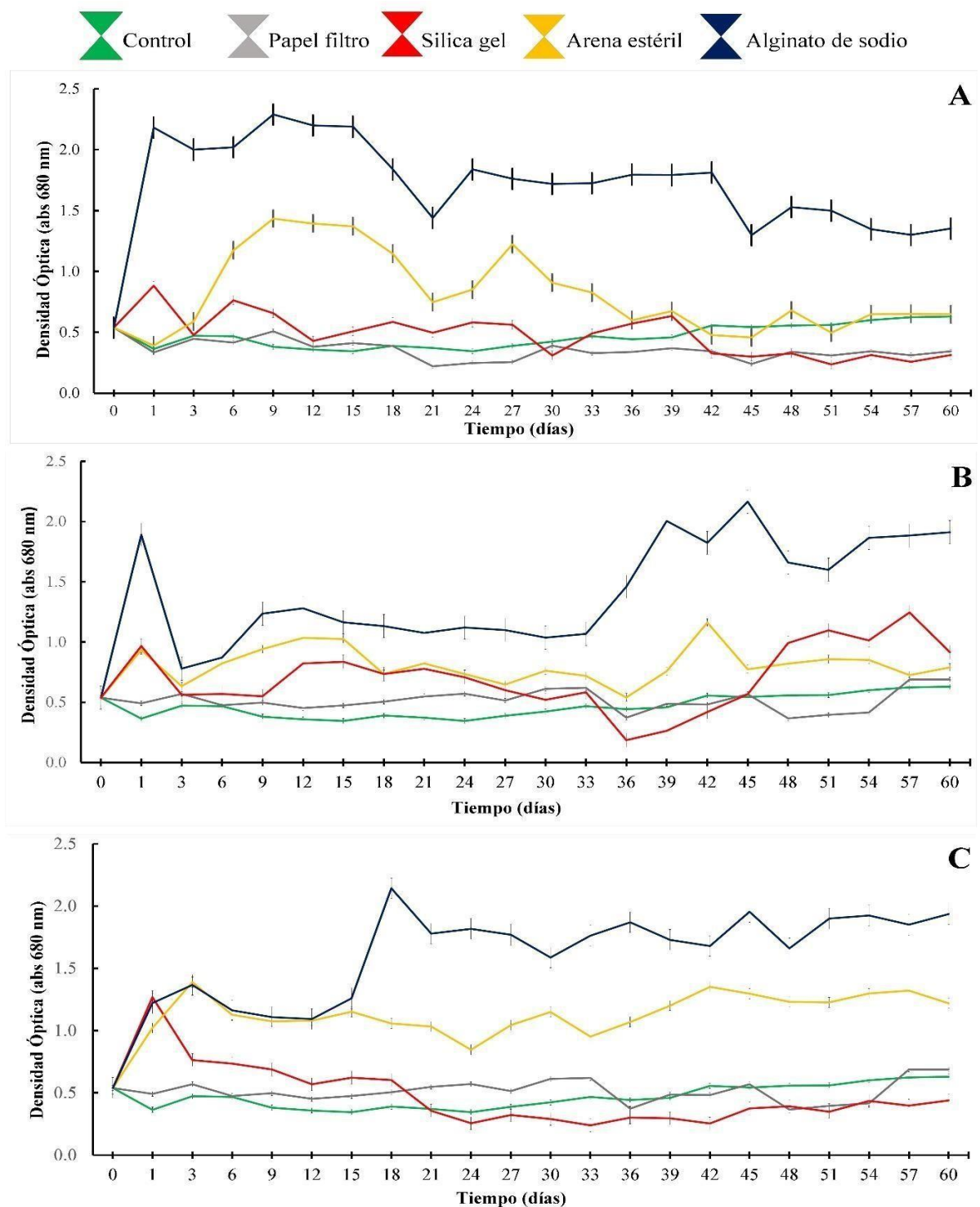


Figura 2. Perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A=15 días, B= 30 días y C= 60 días), hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.

Así mismo el ensayo que presenta mayor estabilidad, menor variabilidad en su curva de crecimiento es el que se realizó en el periodo de 60 días de desecación (2C), evidenciando una fase exponencial en la evaluación de su crecimiento celular en el día 18, advirtiéndose un aumento de su densidad óptica de 2.144 ng/mL de absorbancia, manteniéndose hasta el último día de evaluación después de la hidratación celular.

Sin embargo, los ensayos realizados a los 30 días de evaluación (2B) expone menor estabilidad y fluctuación en su curva de crecimiento, siendo el periodo de desecación con menor crecimiento, manifestando varios periodos exponenciales en su evaluación siendo el día 45 el que presenta un aumento de su densidad óptica más alta de la evaluación después de la hidratación celular con 2.005 ng/mL. Estos resultados evidencian que el desecante alginato de sodio tuvo un efecto estimulante sobre el crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus* sp.

Del mismo modo en la figura 2 (A, B y C) el desecante arena estéril manifestó un crecimiento celular semejante a lo registrado con matriz de alginato de sodio, siendo el ensayo realizado a los 60 días (2C) el que presenta mayor crecimiento celular ostentando su fase exponencial el día 57 con una densidad óptica de 1.321 ng/mL, mostrando menor variabilidad y fluctuación en cuanto a los periodos de desecación de 15 y 30 días, siendo el sustrato que presenta mejor conservación con respecto a los otros tratamientos (silica gel y papel filtro) y grupo control, encontrándose un crecimiento característico entre concentraciones.

Silica gel y papel filtro son los ensayos que presentan menor concentración en su densidad óptica a diferencia de los otros ensayos realizados con los desecantes alginato de sodio y arena estéril en los tres periodos, donde se exhibe que el desecante silica gel presenta mayor densidad óptica que el ensayo realizado con papel filtro mostrando una mayor absorbancia en el periodo de desecación de 30

días (2B) a diferencia de los periodos de 15 días (2A) y 60 días (2C). Ostentando una fase exponencial el día 57 con una densidad óptica de 1.246 ng/mL.

El ensayo que presento menor absorbancia con respecto a los otros tratamientos y grupo control en los tres tiempos de conservación fue el realizado con el desecante papel filtro a los 60 días de desecación (2C), el cual registra una fase de muerte el día 18 con 0.56 ng/mL, llegando a una densidad óptica promedio de 0.134 ng/mL, así papel filtro fue el ensayo que experimento el crecimiento más bajo, por lo que se refleja que el desecante tuvo un efecto inhibitorio sobre la especie, no encontrándose diferencias significativas entre concentraciones.

En las figuras 3 (A, B y C) se reflejan los resultados de los ensayos realizados con *Chlorella* sp, se observa el perfil de crecimiento de la especie luego de ser sometida a tres periodos de desecación (15, 30 y 60 días), con cuatro descantes diferentes, e inmediatamente de ser hidratadas y puestas a evaluación por 60 días, cuyo cultivo inicial partió de 0.571 de absorbancia a una densidad óptica (DO) de 680 nm, lo cual indica un buen perfil de crecimiento, observando que la presencia de los desecantes tuvo efectos significativos, con algunas diferencias particulares dependiendo del tipo de desecante.

Dichas figuras, presentan fluctuaciones en los cuatro tratamientos y el grupo control a lo largo de la evaluación de 60 días, lo cual indica que conforme transcurrieron los días la curva se incrementó gradualmente, obteniendo un perfil de crecimiento característicos el ensayo realizado con matriz de alginato de sodio, en los tres periodos de desecación (15, 30 y 60 días).

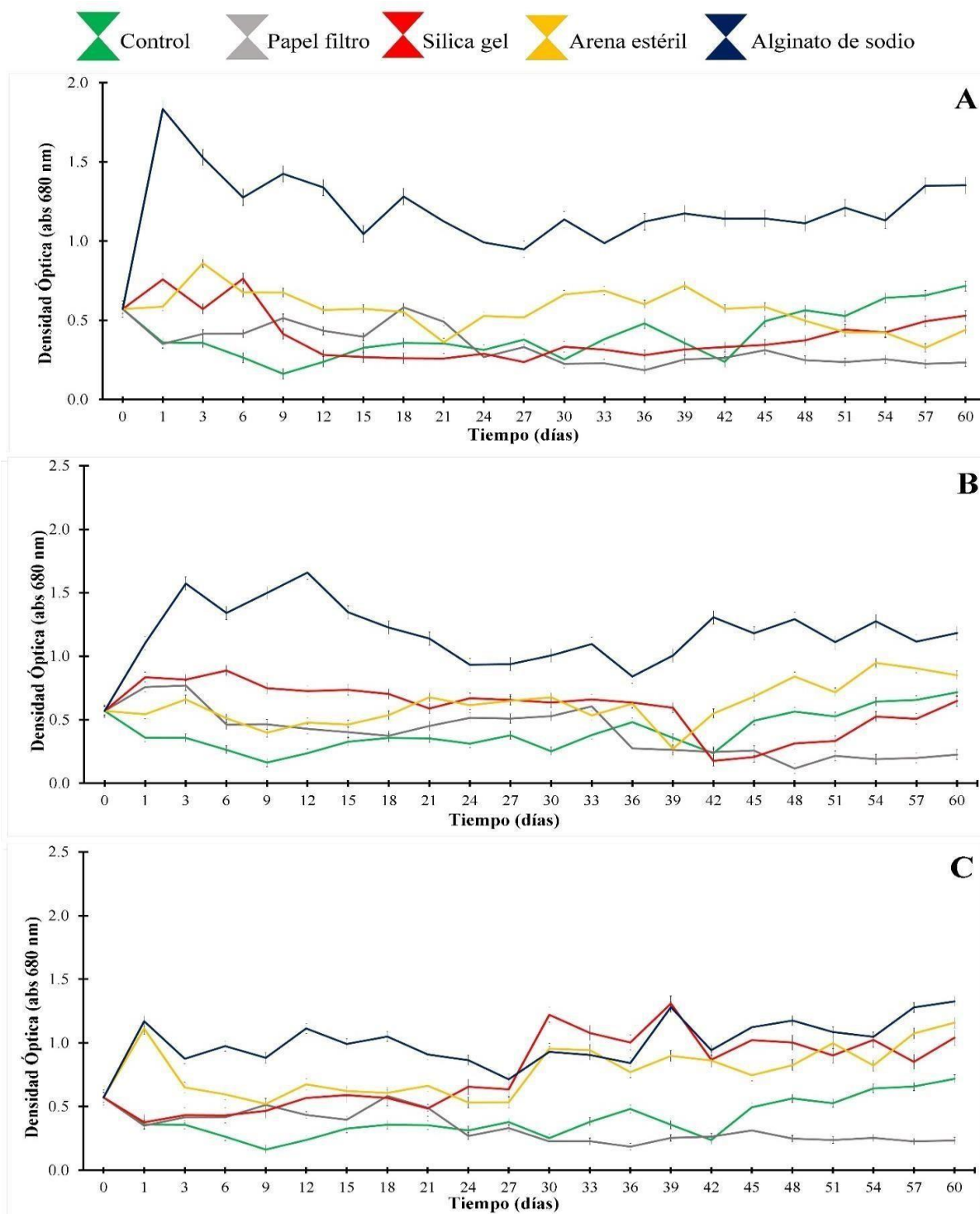


Figura 3. Perfil de crecimiento de *Chlorella* sp después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A=15 días, B= 30 días y C= 60 días), hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.

El perfil de crecimiento de *Chlorella* sp al primer periodo de desecación (15 días) de sometido a los agentes desecantes se muestra en la figura 3A, donde se observa que el agente desecante alginato de sodio alcanzando su fase exponencial el al tercer día de ensayo con una lectura de la DO₆₈₀ de 1.834 ng/mL en su curva de crecimiento, luego una estabilidad entre el día 15 hasta el día 54, seguida de una ligera fase exponencial de crecimiento hasta el día 60, siendo el ensayo que exhibe una mayor densidad óptica, respecto a los otros agentes desecantes. Así mismo se observa que los agentes desecantes (papel filtro, arena estéril y silica gel) tuvieron en promedio una lectura de la DO₆₈₀ de 0,400 ng/mL durante los 60 días de evaluación. Observándose en general que el agente desecante alginato de sodio tuvo un mejor efecto sobre el crecimiento celular en *Chlorella* sp en el primer periodo (15 días) de sometido a desecación.

El perfil de crecimiento de *Chlorella* sp al segundo periodo de desecación (30 días) de sometido a los agentes desecantes se muestra en la figura 3B, donde se observa nuevamente que el agente desecante alginato de sodio alcanza su fase exponencial en el día 12 del ensayo con una DO₆₈₀ de 1.658 ng/mL en su curva de crecimiento, luego una ligera caída y una estabilidad hasta el día 60. Así mismo se observa que los agentes desecantes (papel filtro, arena estéril y silica gel) tuvieron en promedio una lectura de la DO₆₈₀ de 0,604 ng/mL durante los 60 días de evaluación. Observándose en general nuevamente que el agente desecante alginato de sodio tuvo un mejor efecto sobre el crecimiento celular respecto a los agentes desecantes (papel filtro, arena estéril y silica gel) en *Chlorella* sp al segundo periodo de desecación (30 días).

El perfil de crecimiento de *Chlorella* sp al tercer periodo de desecación (60 días) de sometido a los agentes desecantes (alginato de sodio, papel filtro, arena estéril y silica gel) se muestra en la figura 3C, donde se observa que los agentes desecantes (alginato de sodio, silica gel y arena estéril) no muestran diferencias marcadas en su perfil de crecimiento, alcanzando una lectura en promedio de la DO₆₈₀ de 0.868

ng/mL, en su curva de crecimiento hasta los 60 días del ensayo, aunque existe un ligero crecimiento a partir del día 27 hasta el día 60, sin embargo, no existe marcada diferencia. Así mismo se observa que el agente desecante (papel filtro) tuvo un crecimiento celular por debajo del control a partir del día 24 hasta el día 60 del ensayo.

En conclusión, ninguno de los agentes desecantes del tercer periodo de desecación (60 días) mostró diferencias marcadas en su perfil de crecimiento respecto al primer y segundo periodo de desecación (15 y 30 días).

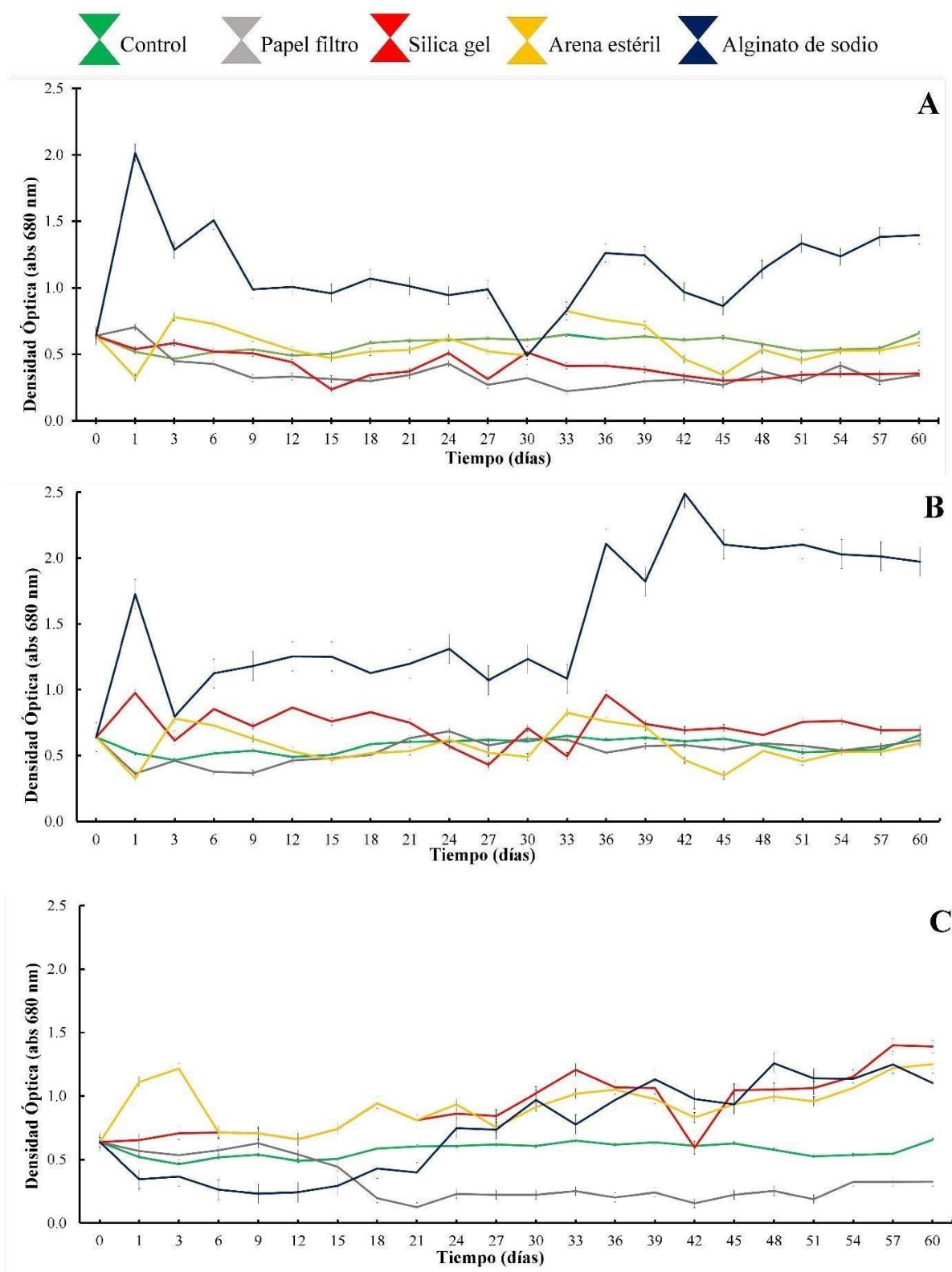


Figura 4. Perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp después de ser sometidas a tres tiempos de desecación (A =15 días, B = 30 días y C = 60 días) hidratadas y puestas a evaluación por 60 días.

El perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp al primer periodo de desecación (15 días) de ser sometido a los agentes desecantes se muestra en la figura 4A, donde se observa que el agente desecante alginato de sodio alcanzando su fase exponencial en el primer día del ensayo con una densidad óptica (DO_{680}) de 2.489 ng/mL en su curva de crecimiento, luego hay un periodo de decadencia del crecimiento celular, comenzando por el día 3 hasta el día 30 donde alcanza una caída máxima de la lectura de la densidad óptica (DO_{680}) de 0.490 ng/mL. Sin embargo, luego hay una recuperación en el crecimiento celular hasta el día 60 alcanzando una lectura de la densidad óptica (DO_{680}) de 1.397 ng/mL.

Observándose en general que el agente desecante alginato de sodio tuvo un mejor efecto sobre el crecimiento celular en *Scenedesmus* sp en el primer periodo (15 días) de sometido a desecación, respecto a los otros agentes desecantes (papel filtro, arena estéril y silica gel).

El perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp al segundo periodo de desecación (30 días) de sometido a los agentes desecantes se muestra en la figura 4B, donde se observa nuevamente que el agente desecante alginato de sodio alcanza su fase exponencial máxima en el día 42 del ensayo con una lectura de la DO_{680} de 2.489 ng/mL en su curva de crecimiento, culminando en el día 60 con una lectura de la DO_{680} de 1.972 ng/mL.

Aunque, al inicio del ensayo, en el día 1 hay un pico de crecimiento en la lectura de su DO_{680} de 1.726 ng/mL, sin embargo, luego solo en el día 3 hay una caída y luego estabilidad de crecimiento celular hasta el día 33. Así mismo se observa que los agentes desecantes (papel filtro, arena estéril y silica gel) tuvieron en promedio una lectura de DO_{680} de 0,681 ng/mL durante los 60 días de evaluación. Observándose en general nuevamente que el agente desecante alginato de sodio tuvo un mejor efecto sobre el crecimiento celular en *Scenedesmus* sp al segundo periodo de desecación (30 días).

El perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp al tercer periodo de desecación (60 días) de sometido a los agentes desecantes (alginato de sodio, papel filtro, arena estéril y silica gel) se muestra en la figura 4C, donde se observa que los agentes desecantes (alginato de sodio, silica gel y arena estéril) no muestran diferencias marcadas en su perfil de crecimiento, alcanzando en promedio una lectura de la DO₆₈₀ de 0.866 ng/mL respectivamente, en su curva de crecimiento hasta los 60 días de ensayo, aunque existe un ligero crecimiento a partir del día 21 hasta el día 60 culminando en una lectura de la DO₆₈₀ de 1.348 ng/mL, sin embargo, no existe marcada diferencia entre los tres desecantes. Así mismo se observa que el agente desecante (papel filtro) tuvo un crecimiento celular por debajo del control a partir del día 15 hasta el día 60 del ensayo. En conclusión, ninguno de los agentes desecantes del tercer periodo de desecación (60 días) mostró diferencias marcadas en su perfil de crecimiento respecto al primer y segundo periodo de desecación (15 y 30 días).

3.1.2. Identificación morfológica celular de las microalgas *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, a los 15, 30 y 60 días después de ser sometidas a desecación.

3.1.2.1. Caracterización morfológica

Se partió de muestras unialgales cultivadas por 6 semanas en medio de cultivo BG – 11, el cual previo ensayo de desecación se realizó una identificación y caracterización morfológica de la especie, se extrajo una alícuota no mayor a 10µL del cultivo en experimentación para el análisis morfológico, se colocó en un portaobjetos y se observó en 40x a través del microscopio de luz invertida DMI1. Para *Chlorella* sp (*Beijerinck; 1980*) (20) las características morfológicas de la cepa microalgal sometida a los métodos de desecación son: Buena coloración, de forma semi esférica, con pared celular delgada, con pirenoides, coloración verde vigoroso, con distinción de clorofila, envoltura gelatinosa y autoesporas.

Para *Ankistrodesmus* sp (Corda, 1838) (21) las características morfológicas de la cepa microalgal sometida a los métodos de desecación son: Buena coloración con formación de colonias, presentan un cuerpo alargado relativamente curvo en su parte central y extremos agudos en forma de huso, en su interior, no presenta alteración genética sin embargo en una observación microscópica a 40X, las colonias microalgales se muestran diluidas, no presenta envoltura gelatinosa, con presencia de pirenoides, células más largas que anchas, pared celular lisa.

Para *Scenedesmus* sp (Meyen, 1829) (22) las características morfológicas de la cepa microalgal sometida a los métodos de desecación son: Cenobios de 2 – 4 células, no móviles alineados, irregularmente alternos con los extremos cónicos, con engrosamiento apical, curvos. Cloroplastos parietales con pirenoide.

Se observó durante todos los análisis microscópicos que no existe mayor contaminación, puesto que sus características tales como: color, forma, no varían en demasía, siendo las especies *Ankistrodesmus* sp y *Scenedesmus* sp, las cepas que muestran una diferenciación en su morfología, para la primera una disminución de su densidad óptica y para la segunda el incremento de microorganismos contaminante, volviéndola así un cultivo no axénico, además de que presenta alteración morfológica, reduciendo su característica cenobial. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del día 0 al día 60, diferencias de las características morfológicas de las microalgas al ser sometidas a desecación por periodos de 15, 30 y 60 días; las características morfológicas de las tres especies microalgales (*Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp) estudiados, se describen en la figura 5 (A, B y C) éstas representan las fotografías de antes y después de las microalgas sometidas a desecación mostrando las variaciones que obtuvieron en dichos ensayos, las cuales se clasifican de acuerdo a caracteres establecidos como naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, presencia y número de flagelos, pirenoides, número de células, formación de colonias, autoesporas entre otros. Se determinó forma, color, dicha variación se exhibe más ampliamente en la tabla 1 y 2 del anexo, donde se muestran las variaciones morfológicas de antes y después de las microalgas estudiadas.

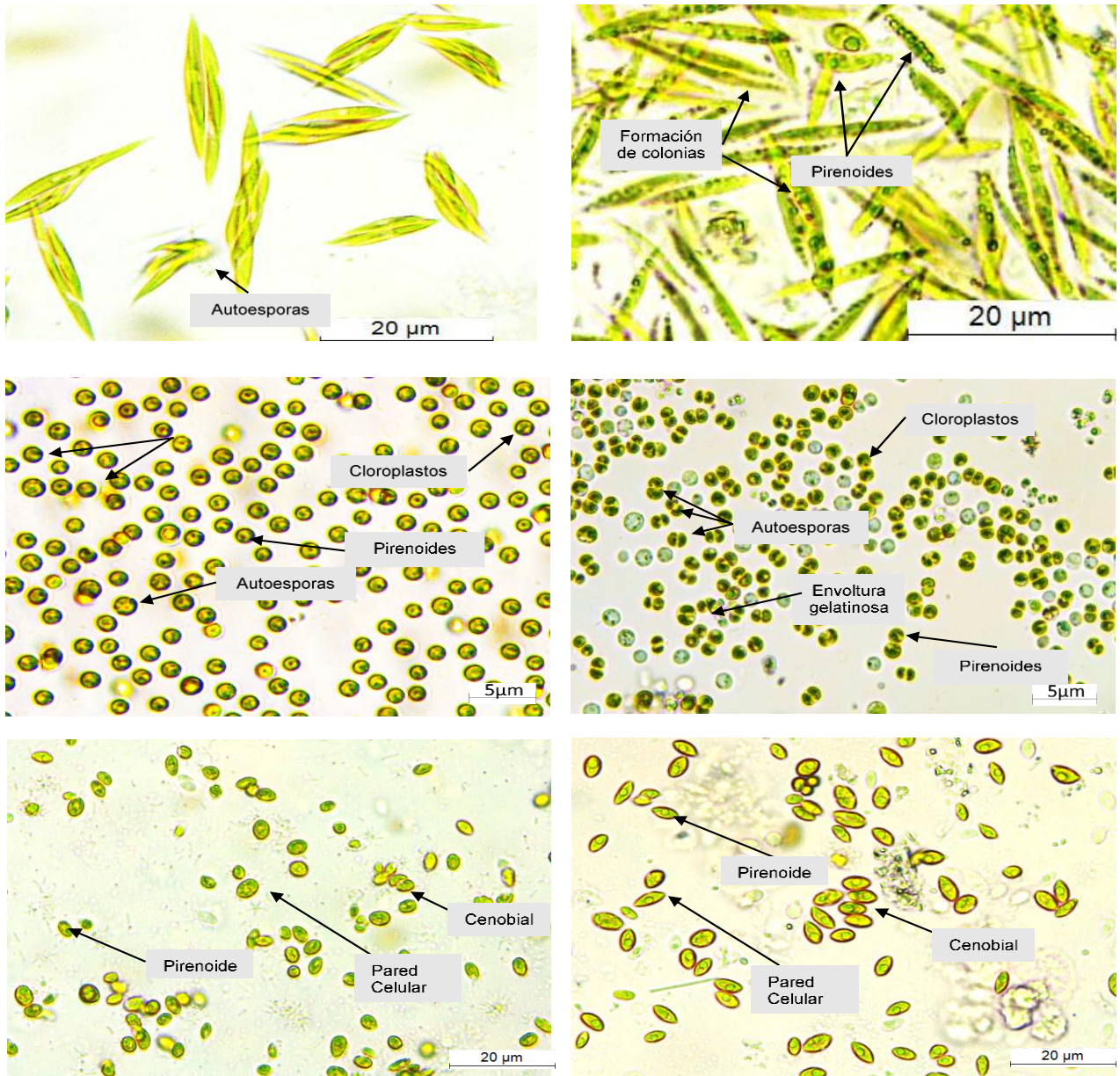


Figura 5. Variaciones morfológicas antes y después de someter a las tres especies de microalgas desecación (A= *Ankistrodesmus* sp, b= *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp)

3.1.3. Determinación del método de desecación para conservar microalgas

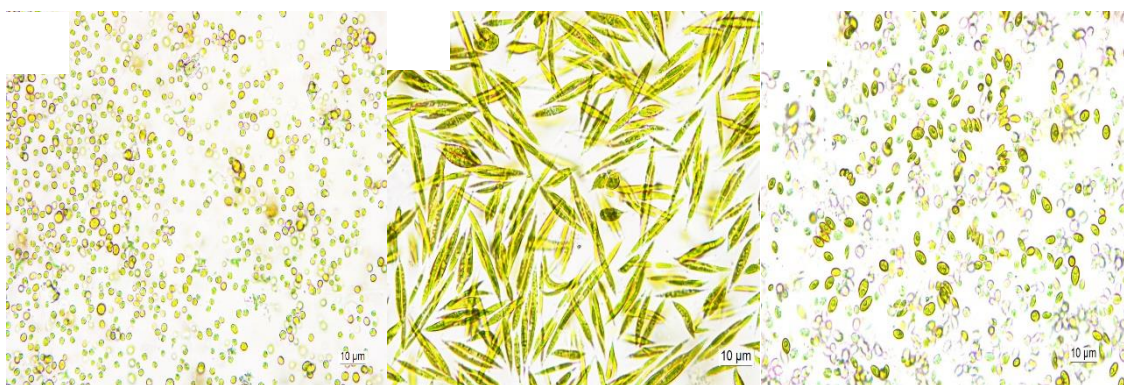


Figura 6. Cultivos unialgales de tres especies de microalgas (A= *Chlorella* sp, B= *Ankistrodesmus* sp y C= *Scenedesmus* sp)

Ankistrodesmus sp y *Chlorella* sp, no presentaron mayores problemas en su viabilidad ni contaminación con bacterias u hongos, por la cual se determinó que el grado de axenidad fue óptimo, manteniendo su viabilidad en su perfil de crecimiento en la gran mayoría de ensayos realizados con los cuatro tipos de desecantes utilizados en los tres tiempos de evaluación, no presentan de forma significativa cambios en su morfología, sin embargo; conjuntamente a ello desarrolla crecimiento de su composición proteica, debido a la presencia de pirenoides, además de la formación de colonias en las tres especies, siendo *Ankistrodesmus* sp, el que muestra mayor presencia de pirenoides; este aumento está en relación con incremento en su densidad y crecimiento celular en los ensayos sometido a periodos de desecación de 15, 30 y 60 días (Figura 5 A, B y C) de ser sometidas a desecación, a excepción de los ensayos realizados con *Ankistrodesmus* sp y *Chlorella* sp en el periodo de desecación de 15 días de ser sometidas, al igual que la evaluación realizada con *Scenedesmus* sp con el método desecación por encapsulación – deshidratación en matriz de alginato de sodio en el periodo de desecación de 60 días, ya que presentó resistencia en su crecimiento, variabilidad en su morfología y despigmentación.

Los resultados que menor variabilidad en su estabilidad y sus características morfológicas en las tres especies sometidas a desecación fueron silica gel y arena

estéril, este efecto puede deberse a una adición de medio de cultivo BG – 11 mayor al necesario, inhibiendo el crecimiento por un periodo corto de tiempo en la evaluación, manifestando así, una baja absorbancia con poca mutabilidad de concentración en todo el proceso, presentando mayor crecimiento en su densidad, además de acrecentar su composición proteica, con mayor presencia de pirenoides.

Asimismo, se determinó que las concentraciones más significativas para cada colonia de cepas microalgales evaluadas y menor mutación lo manifestó el método realizado con arena estéril seguido por silica gel, las cuales presentaron afinidad a las especies cultivas, siendo el periodo de desecación por 30 días el que presenta resultados fenotípicos y estabilidad morfológica positivas.

Los métodos realizados por matriz de alginato de sodio y arena estéril, presentan proliferación en su concentración, siendo esté un método adecuado si lo que se quiere es incrementar la densidad de biomasa de las especies, sin embargo, como ya se indicó en líneas anteriores para el desecante alginato de sodio existe riesgo de contaminación si se establece mayor periodo de almacenamiento, tal como lo presentó *Scenedesmus* sp en el periodo de desecación de 60 días de ser sometidas, además de que arena estéril manifestó en la especie *Chlorella* sp, cambio en su composición morfológica, aumentando así el tamaño de sus dimensiones.

3.2. Discusión

Debido a la gran diversidad que representan los microorganismos, solo existen un limitado reporte de un método óptimo de conservación para estos en general, incluso para un grupo particular de microorganismos como son las microalgas, las cuales son conocidas actualmente como alternativa promisoría de energía renovable por su gran potencial biotecnológico y biológico en diversos campos, debido a su alta diversidad metabólica (4).

La desecación es una herramienta para la conservación de organismos vivos en eventos extremos de deshidratación en su organismo sin sufrir daño irreparable (23). Dicha herramienta en la actualidad tiene una limitada investigación científica, la mayoría de estudios sobre este tipo de método de conservación son realizados en cuanto a la tolerancia a la desecación y estrés, siendo básicamente investigaciones sobre plantas (7), lo cual sugiere que el estudio en microalgas dulceacuícolas es finito, dando como resultado un potencial proyecto de investigación en la Amazonía sobre este tipo de conservación (1, 13, 14, 16, 27–29). La tolerancia a la desecación de las microalgas se ha informado previamente en cianobacterias terrestres (Cameron 1962; Dodds *et al.* 1995; Sakamoto *et al.* 2009), algas verdes del desierto (Gray *et al.* 2007), algas fototróficas de biofilms (Häubner *et al.* 2006 ; Rindi 2007 ; Gustavs *et al.* 2010) y algas del suelo alpino (Karsten *et al.* 2010 ; Holzinger *et al.* 2011). Davis en 1972, informó que, especialmente en las algas verdes, la tolerancia a la desecación está bien representada: entre 72 géneros (119 especies) de algas verdes; 17 géneros (25 especies) tienen células vegetativas tolerantes a la desecación, 11 géneros (19 especies) tienen células reproductoras tolerantes a la desecación, y 26 géneros (29 especies) tienen quistes tolerantes a la desecación y células en reposo. Sin embargo, los mecanismos subyacentes de la tolerancia a la desecación en las algas verdes, y los componentes y las vías que los facilitan se entienden solo en parte. (13, 14)

En los ensayos realizados para los métodos de desecación se cumplió el objetivo de la prueba el cual fue realizar una desecación total (29), así como evaluar un método de conservación apropiado para conservar microalgas, consistiendo en que las tres especies

microalgales se expusieron a cuatro tipos de tratamientos que se realizaron a periodos de 15, 30 y 60 días. Con respecto a los métodos de desecación por los cuatro tipos de desecantes se pudo establecer que el método con arena estéril permitió mayor viabilidad (30) y estabilidad morfológica en las tres cepas microalgales como son *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp sometidas a 15, 30 y 60 días, esto concuerda con Ortiz 2016, que nos establece que el 86% de los aislamientos realizados con arena estéril presenta mayor afinidad como matriz de conservación obteniendo resultados óptimos en cuanto a la viabilidad (30). Según Hodgson, 1987 y Glynn & Heinke, 1999; la arena tiene un tamaño de 0,10 a 0,25 mm, lo cual limita el paso de agua, aire, entre otros factores que pueden beneficiar el crecimiento de las microalgas, por lo tanto, permite la conservación de estos microorganismos sin influir en su cinética de crecimiento (31, 32).

Sin embargo, la técnica de encapsulación – deshidratación ha sido satisfactoria en cuanto a la producción de biomasa e incremento de la concentración en su fase de crecimiento, el estudio mostró la habilidad de la matriz al someterlo a pequeñas esferas de alginato a diferentes periodos de almacenamiento sean 15, 30 y 60 días, indistintamente el éxito obtenido con este método se debe a que está matriz es polimerizada con cloruro de calcio formando así una cápsula gel alrededor de la matriz siendo reforzada el crioprotector sacarosa al 0.75 M, lo que incremento los resultados de recuperación y supervivencia de las especies microalgales encapsuladas sometiendo la cepa a una corriente de aire como en un flujo laminar, siendo sellada en una bolsa hermética que contenga silica gel para deshidratación de las cápsulas (33). Al igual que nos indica Scocco & Rey, 2004; que realizó una matriz de alginato polimerizada con cloruro de calcio reforzado con Sacarosa (0,5 M a 1,5 M) a explantes de yemas de axilares de patatas por método de encapsulación – deshidratación para criopreservación donde se obtuvo una supervivencia de 67 % en la formación de los brotes, difiriendo con el presente estudio el cual obtuvo un 87 % de viabilidad en su proceso. (34). Este método de encapsulación – deshidratación se muestra como un eficiente método de desecación en *Ankistrodesmus* sp y *Chlorella* sp.

Esto concierne con los estudios que patentaron Kuehnle y Champagne (2010), sobre la “Conservación y composición de algas de bioproceso para la producción de lípidos, semillas y alimentación”, de las cuales realizando una revisión exhaustiva sobre los nuevos métodos para el cultivo, cosecha y preservación de cultivos algales. De las cuales los resultados indicaron que el almacenamiento en papel filtro y matriz de alginato por microencapsulación son suficientes para el largo plazo de almacenamiento para la viabilidad de las microalgas, y que la adición de un agente protector antes de la incorporación de alginato es factible para la recuperación celular después de la conservación, sin embargo, la conservación en papel filtro, se recomiendan solo en *Tetraselmis*, puesto que existe un recrecimiento subóptimo para otras cepas, por ejemplo; *Chlorella* que presenta cerca del 42 % de su densidad inicial (18). Sin embargo, en *Scenedesmus* sp, se muestra que a medida que aumentó el periodo de almacenamiento como lo es en el periodo de tiempo de 60 días, se observó una disminución de su concentración de la biomasa celular, esto fue reportado por Li et al, 2011, que en un exceso de nutrientes en el medio propicia inhibición del crecimiento. (32, 33). Como reportó Cai T, 2013 & Naduca, 2015 que en *Scenedesmus* sp y la microalga *Chlorella* sp disminuyó la concentración de biomasa celular debido a un exceso de nutrientes cuando se cultivó en agua residual doméstica. (38, 39).

Los tratamientos por silica gel presentaron afinidad a las especies cultivadas sometidas a desecación; lo que ha sido reportado como posible método de conservación, ya que en diversos ensayos presenta resultados fenotípicos y de estabilidad genética positivos, sin embargo, el tratamiento realizado por un periodo de tiempo de 15 días y 60 días, representó una baja producción de biomasa, por consecuencia bajo índice de absorbancia en las especies microalgales analizadas, esto puede ser presentado por una adición mayor de medio de cultivo BG – 11 al inóculo microalgal necesario. Empero estableciendo la cantidad óptima de medio de cultivo, el crecimiento microalgal fue continuo. (4, 38, 40). Esto se sustenta con lo afirmado Arredondo y Vásquez, 1991(41); quienes indicaron que cada especie de microalga responde de manera diferente ante la disponibilidad de nutrientes, esto coincide además con Parra, 2006 y Sosa, 2001 quienes exponen que los métodos de conservación con silica gel presentan una viabilidad > 90% en aislados con hongos

filamentosos.(23) de las cuales Gutiérrez, 2006; nos indica que la viabilidad del desecante en las especies cultivadas para los ensayos comprueba la efectividad del método para mantenerlos por largos periodos de tiempo(24). Siendo Alarcón, 2006; quién indica que la declinación en las características deseables de una cepa, se atribuyen a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma (6).

En el tratamiento con Papel filtro se observó crecimiento bacteriano, el cual podría ser un indicador de que el inóculo utilizado no se encontraba puro o el manipulador no realizó la conservación adecuadamente, ya que los cuadros de papel filtro se encontraban húmedos generando el desarrollo de diferentes microorganismos porque había agua disponible para su desarrollo. Tal como lo indican Serna y Cano, 2014; que una de las desventajas de este método es que no utiliza ningún agente protector por lo cual la célula está expuesta para tener algún tipo de daño, además de tener altos riesgos de contaminación (25). Por lo tanto, ante condiciones de estrés fisiológico el comportamiento de las microalgas es variable entre las distintas especies tal como lo indican Shin *et al.*, 2018; Arias *et al.*, 2013. (47)

El tratamiento con arena estéril fue el que presentó mayor capacidad de conservación, lo cual concuerda con Gutiérrez *et al.*, 2017; que realizando experimentaciones sobre la preservación en colecciones con hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos, conservaron 421 cepas disponibles, dicho estudio resultó con un 90 % del material en colección y un 3 % de estos en arena estéril (19), lo cual coincide con Ortiz, 2016, que nos indica, que se existe una mayor afinidad en arena estéril como matriz de conservación obteniendo resultados óptimos en cuanto a la viabilidad (20). Ya que, según Hodgson,1987 y Glynn & Heinke,1999; la arena tiene un tamaño de 0.10 a 0.25 mm, lo cual limita el paso de agua, aire, entre otros factores que pueden beneficiar el crecimiento de las microalgas, por lo tanto, permite la conservación de estos microorganismos sin influir en su cinética de crecimiento (21, 22).

El crecimiento fue un parámetro fundamental para determinar la susceptibilidad de los métodos en experimentación sobre *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, mostrando un perfil de crecimiento diferencial al cual respondió de manera heterogénea a las

condiciones de almacenamiento en cada método de desecación evaluado. Esto coincide con Bumbak *et al.*, 2012; Markou *et al.*, 2012. Que manifiestan que el modo de la nutrición utilizado por la microalga generalmente influye en la tasa de crecimiento, la densidad celular y la composición de la biomasa microalgal (50), además como lo indican Cobos, M *et al.*, 2016, algunas especies de microalgas tienen la capacidad de modificar el metabolismo como respuesta a los cambios en las condiciones del medio (51), el crecimiento diferencial también podría deberse a que los métodos de conservación fueron aplicados para otros grupos de microorganismos diferentes a las microalgas, ya que por este motivo el estrés al que fue sometida la cepa microalgal fue mayor al que se sometió a actino bacterias (30, 44), hongos filamentosos, simbiontes y patógenos, (6, 45) o materiales vegetales (34).

El perfil de crecimiento en las tres especies microalgales evaluadas fue mayor en medio de cultivo BG – 11 con el método de desecación por encapsulamiento en matriz de Alginato de Sodio a excepción de *Scenedesmus* sp sometido a estos por 60 días que mostró un resultado diferente, siendo a partir del día 30 una especie no axénica, mostrando rasgos de otros microorganismos. *Ankistrodesmus* sp mostró un mayor perfil de crecimiento, en la mayoría de los ensayos realizados a excepción de los realizados a 60 días de evaluación por el método de papel filtro, exponiendo una disminución muy notoria de su densidad óptica. Esto coincide con lo escrito por López, 2016, que la curva de crecimiento depende del tiempo de cultivo y la adición de nutrientes al medio, de las cuales Serna y Cano, 2014, nos enseñan que el proceso de conservación siempre puede estar expuesto a contaminación (44, 46). Así mismo, Urcia y Díaz (29) sugieren que el perfil de crecimiento de las microalgas puede ser alterado sustancialmente por la manipulación en las condiciones de cultivo (43). Lo cual en revisiones realizadas por Barsanti & Gualtieri, 2014, nos indican que los parámetros óptimos y rangos tolerables son específicos para cada especie (49).

Las características morfológicas son variables para las especies microalgales estudiadas, tal como nos indica Maldonado, 2011(48), que la aclimatación de las microalgas, a la restricción o incremento de nutrientes se caracteriza respuestas generales tales como cambios morfológicos, de los cuales en el presente estudio está muy bien figurado. tales como el aumento de la visibilidad de pirenoides, formaciones cenobiales, inhibición o crecimiento del tamaño de las cepas de estudio, mayor formación de autoesporas y envolturas gelatinosas, lo cual conviene con Komárek y Fott, 1983, que establecen que, no todos los rasgos morfológicos nos ofrecen el mismo valor taxonómico, y esto provoca que, según los caracteres que cada autor selecciona como válidos, las concepciones de los géneros y especies varíe (48).

Es por este motivo que es importante estandarizar un método de desecación para la conservación de cepas microalgales, por lo tanto, la respuesta a los métodos dependerá sustancialmente de cada especie, por ello se recomienda continuar con la estandarización de protocolos de desecación con otras cepas microalgales con el fin de lograr una conservación sin contaminación ni riesgo de alteración genética manteniendo así una viabilidad con potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas (41).

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Los métodos de desecación por arena estéril y silica gel fueron los más adecuados para la conservación y en el mantenimiento de las cepas retardando en gran medida cambios degenerativos en las células, sin embargo; nuestros resultados muestran que en las evaluaciones de viabilidad por periodos prolongados de tiempo se determinan que alginato de sodio presenta resultados más eficaces en cuanto a su concentración, mayor a los métodos realizados por arena estéril y silica gel.
- Dentro de los tiempos tres tiempos de almacenamiento de las microalgas *Ankistrodesmus sp.*, *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, se pudo observar que existe mayor viabilidad, menor fluctuación en el perfil de crecimiento de las tres especies en los ensayos sometidos por 30 días con los distintos desecantes.
- Las cepas evaluadas no presentaron mayores problemas en su viabilidad ni contaminantes con otros microorganismos, por lo que la pureza fue óptima, y su estabilidad morfológica buena a excepción de *Scenedesmus sp.* conservado por 60 días y *Ankistrodesmus sp.* por 15 días, que presentó inhibición en la concentración de su crecimiento microalgal.

4.2. Recomendaciones

- Evaluar la conservación de las cepas microalgales con un tiempo mínimo de 6 meses para así obtener valores significativos en un periodo de almacenamiento a largo plazo.
- Realizar la conservación con otro tipo de cepas microalgales o microorganismos para evaluar la efectividad de los métodos de conservación empleados.
- Llevar a cabo este estudio utilizando otro tipo de agentes protectores, así como otros tipos de desecantes y evaluar a efectividad que poseen.
- Es necesario evaluar, nuevamente la metodología de conservación por arena estéril y silica gel, teniendo en cuenta que se exhiben como técnicas eficientes.

CAPÍTULO V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. BHEDA, B, SHENDA, M, GHADGE, R and THORAD, B. Drying of algae by various drying methods. In: *Proceedings of 21th International Drying Symposium* [online]. Universitat Politècnica València, 11 September 2018. [Accessed 22 November 2019]. ISBN 978-84-9048-688-7. Available from: <http://ocs.editorial.upv.es/index.php/IDS/IDS2018/paper/view/7761>
2. *Handbook of micrionalgae - based processed and products fundamentals and advances in energy, food, feed, fertilizer, and bioactive compounds*. [online]. Place of publication not identified: Academic Press, an imprint of ELSEVIER, 2020. [Accessed 3 August 2020]. ISBN 978-0-12-818537-7. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=2367343>
3. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas | Biotecnología. [online]. [Accessed 7 November 2018]. Available from: <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2017/03/23/aplicaciones-biotecnologicas-de-las-microalgas/>
4. COBOS M., CASTRO J. and VARGAS G. *Protocolos para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas*. Primera edición. Perú, 2016.
5. SOUSA, M. *Desenvolvimento de métodos otimizados para criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta)*. GURUPI - TO: Universidade Federal do Tocantins Campus Universitário de Gurupi Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.
6. ALARCON, D. evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. 2006. P. 152.
7. PAREDES, E., COSTAS D., CASAL A. and COTINA - BURGUEÑO L. M. *Lubian. 2013 Criopreservación de microalgas marinas: Nannochloropsis gaditana Rhodomonas lens, Cylindrotheca closterium, Chaetoceros gracilis, Synechococcus sp. e Isochrysis aff. galbana*

clon T-ISO. V Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui. Cárdenas, S., Mancera, J.M., Rey-Méndez M., Lodeiros C. (Eds), ISBN: 978-84-6959072-0, 2013 pp: 263-272. 2013.

8. CÁRDENAS, D., BARRAGÁN, S. and TRESPALACIOS, A. A. "Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y micro secado sobre tres especies bacterianas": elección del mejor método. 2009. P. 35.

9. KHOO HH, SHARRATT PN, DAS P, BALASUBRAMANIAN RK, NARAHARISETTI PK, SHAIK S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. 2011. No. 10, p. 102.

10. RÍOS SD., TORRES CM., TORRAS C., SALVADÓ J., MATEO-SANZ JM., JIMÉNEZ L. Microalgae-based biodiesel: Economic analysis of downstream process realistic scenarios. *Bioresource Techno*. No. 136:617–25.

11. ARENCIBIA DF, ROSARIO LA, GÁMEZ R. Métodos generales de conservación de microorganismos. 2008.

12. Tolerancia a la desecación en organismos fotosintéticos. *Wikipedia, la enciclopedia libre* [online]. 2020. [Accessed 26 February 2020]. Available from: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Tolerancia_a_la_desecaci%C3%B3n_en_organismos_fotosint%C3%A9ticos&oldid=123675719 Version ID: 123675719

13. GRAY, Dennis W., LEWIS, Louise A. and CARDON, Zoe G. Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Planta, Cell & Environen*. Octubre 2007. Vol. 30, no. 10, p. 1240–1255. DOI 10.1111/j.1365-3040.2007.01704

14. CÁRDENAS, C. E. Identificación de algas y cianobacterias. 2014. Vol. 1, no. 1, p. 6.

15. PARRA HUERTAS, Sandra Liliana, PÉREZ CASAS, María Marcela, BERNAL MORALES, Mauricio, SUÁREZ MORENO, Zulma and MONTOYA CASTAÑO, Dolly. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de

datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*. 15 June 2006. Vol. 4, no. 5, p. 39. DOI 10.22490/24629448.346.

16. GUTIERREZ, Alejandra Concepción, TORNESELLO-GALVÁN, Julieta, MANFRINO, Romina Guadalupe, HIPPERDINGER, Marcela, FALVO, Marianel, D'ALESSANDRO, Celeste and LÓPEZ LASTRA, Claudia Cristina. Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. April 2017. Vol. 49, no. 2, p. 183–188. DOI 10.1016/j.ram.2016.09.007.

17. (PDF) Encapsulación-deshidratación: un nuevo enfoque para la criopreservación de puntas de brotes de *Solanum*. *CryoLetters*. [online]. [Accessed 12 December 2019]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/272784000_Encapsulation-dehydration_A_new_approach_to_cryopreservation_of_Solanum_shoot_tips_CryoLetters

18. GARCÍA-ÁGUILA, Leyanis, FERIA, Manuel de and ACOSTA, Karen. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotechnología Vegetal* [online]. 1 April 2007. Vol. 7, no. 2. [Accessed 9 December 2020]. Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/359>

19. PARRA, Oscar. Estado de conocimiento de las algas dulceacuícolas de Chile (Excepto Bacillariophyceae). *Gayana (Concepción)*. June 2006. Vol. 70, no. 1, p. 8–15. DOI 10.4067/S0717-65382006000100003.

20. *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck]: Algaebase. [online]. [Accessed 12 December 2019]. Available from: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676

21. *Ankistrodesmus* Corda, 1838: Algaebase. [online]. [Accessed 12 December 2019]. Available from: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44102&-session=abv4:AC1F03651d98338DE7IkFAF7A75A

22. Scenedesmus Meyen, 1829: Algaebase. [online]. [Accessed 12 December 2019]. Available from: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&-session=abv4:AC1F184018aff283CDHVFDDCF390
23. ALPERT, P and OLIVER, M. J. *Drying without dying. In Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (ed. M. Black and H. W. Prichard). Wallingford, UK: CAB International., 2002.
24. CANDOTTO CARNIEL, F. ZANELLI, Davi., BERTUZZI, S. and TRETACH, M. Desiccation tolerance and lichenization: a case study with the aero terrestrial microalga *Trebouxia* sp. (Chlorophyta). *Planta*. August 2015. Vol. 242, no. 2, p. 493–505. DOI 10.1007/s00425-015-2319-z. Main conclusions A comparative study of isolated vs. lichenized *Trebouxia* sp. showed that lichenization does not influence the survival capability of the alga to the photo-oxidative stress derived from prolonged desiccation.
25. FUKUDA, S.-y., YAMAKAWA, R., HIRAI, M., KASHINO, Y., KOIKE, H. and SATOH, K. Mechanisms to Avoid Photoinhibition in a Desiccation-Tolerant Cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant and Cell Physiology*. 9 January 2008. Vol. 49, no. 3, p. 488–492. DOI 10.1093/pcp/pcn018.
26. M.M. WATANABE, T. SAWAGUCHI. Cryopreservation of a water-bloom forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, *aeruginosa*. 1995. Vol. 43, p. 111–116.
27. DEMURA, Mikihide, IOKI, Motohide, KAWACHI, Masanobu, NAKAJIMA, Nobuyoshi and WATANABE, Makoto M. Desiccation tolerance of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature tolerance of dehydrated cells. *Journal of Applied Phycology*. February 2014. Vol. 26, no. 1, p. 49–53. DOI 10.1007/s10811-013-0059-7.
28. HOLZINGER, A and BECKER, B. Desiccation tolerance in the streptophyte green alga *Klebsormidium*: The role of phytohormones. *Communicative & Integrative Biology*. 4 July 2015. Vol. 8, no. 4, p. e1059978. DOI 10.1080/19420889.2015.1059978.
29. DIAZ CALAMPA, LILIA VANESSA and URCIA SABOYA,, MARGARITA ALHELI. Aislamiento e identificación de Microalgas Oleaginosas en las Cuencas de los Ríos Amazonas,

Itaya y Nanay, Loreto - 2013. Investigación. IQUITOS - PERU : Universidad Científica del Perú - UCP, 2014.

30. ORTIZ, T, OCAMPO, V, PRADA L. D., FRANCO-CORREA M. Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadoras de fósforo.

31. HODGSON, J. M. *Muestreo y descripción de suelos*. REVERTE, 1987. ISBN 978-84-291-1017-3.

32. GLYNN H, J. and HEINKE, G. W. *Ingeniería Ambiental*. 2ª. Prentice Hill, 1999.

33. SCOCCO, A., H. REY. *Conservación de Germoplasma in vitro*. V. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria., 2004.

34. PASIN, L., AZÓN, G. and GARRIGA, M.. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. P. 22.

35. SÁNCHEZ-CHIANG, N. and JIMÉNEZ, V. M. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomy Mesoamerican*. 1 June 2010. Vol. 21, no. 1, p. 193. DOI 10.15517/am. v21i1.11836.

36. LUKE, A. Deployment of the encapsulation/dehydration protocol to cryopreserve diverse microalgae held at the Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic. P. 6.

in, ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J. and RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 1 April 2011. Vol. 102, no. 8, p. 5138–5144. DOI 10.1016/j.biortech.2011.01.091.

38. NADUCA, H. E. *Utilización de agua miel de café y melaza en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos*. México, 2015.

39. CAI, T., PARK, S. y. and LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 1 March 2013. Vol. 19, p. 360–369. DOI 10.1016/j.rser.2012.11.030.
40. ARREDONDO-VEGA B.O., VOLTOLINA. D. EDS. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. 2007. P. 9.
41. ARREDONDO-VEGA, B.O, VÁZQUEZ-DUHALT, R. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas. . 1991. P. 99–111.
42. PARRA HUERTAS, S. L, PÉREZ CASAS, M.M., BERNAL MORALES, M., SUÁREZ MORENO, Z. and, MONTOYA CASTAÑO, D. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).
43. GUTIERREZ S. J. *Fundamento de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. 1. 2006.
44. SERNA, Daniela Hernández and CANO, Andrea Stephania Loaiza. Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica De Pereira. 2014. P. 89.
45. GUTIERREZ, A. C., TORNESELLO-GALVÁN, J., MANFRINO, R. G., HIPPERDINGER, M., FALVO, M., D'ALESSANDRO, C. and LÓPEZ LASTRA, C. C. Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. April 2017. Vol. 49, no. 2, p. 183–188. DOI 10.1016/j.ram.2016.09.007.
46. LÓPEZ L. K. Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleginosas amazónicas. P. 60.
47. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS: PARÁMETROS DEL CULTIVO QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2013000100004

- 48.. "INDUCCION LIPIDICA POR LIMITACION DE NUTRIENTES EN LAS MICROALGAS *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*." [online]. Available from: <https://1library.co/document/q5mwo7jy-induccion-lipidica-limitacion-nutrientes-microalgas-scenedesmus-chlorella-sorokiniana.html> Siendo así, como era de esperarse los tratamientos S1 y S2 al estar limitados de nitrógeno, las células acumularon una concentración de lípidos superior que el resto de los tratamientos
49. BARSANTI, Laura, & GUALTIERI, Paolo. *Algae: anatomy, biochemistry, and technology*: CRC press 2014.
- BUMBAK, F., S. COOK, V. ZACHLEDER, S. HAUSER, K. KOVAR. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biot.* . 2011. 91(1)31–46.
1. COBOS RUIZ, Marianela, PAREDES RODRÍGUEZ, Jae Diana and CASTRO GÓMEZ, Juan Carlos. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES EN MICROALGAS SOMETIDAS A ESTRÉS NUTRITIVO. *Acta Biológica Colombiana* [online]. 13 November 2015. Vol. 21, no. 1. DOI 10.15446/abc.v21n1.47439.

CAPÍTULO VI: ANEXOS

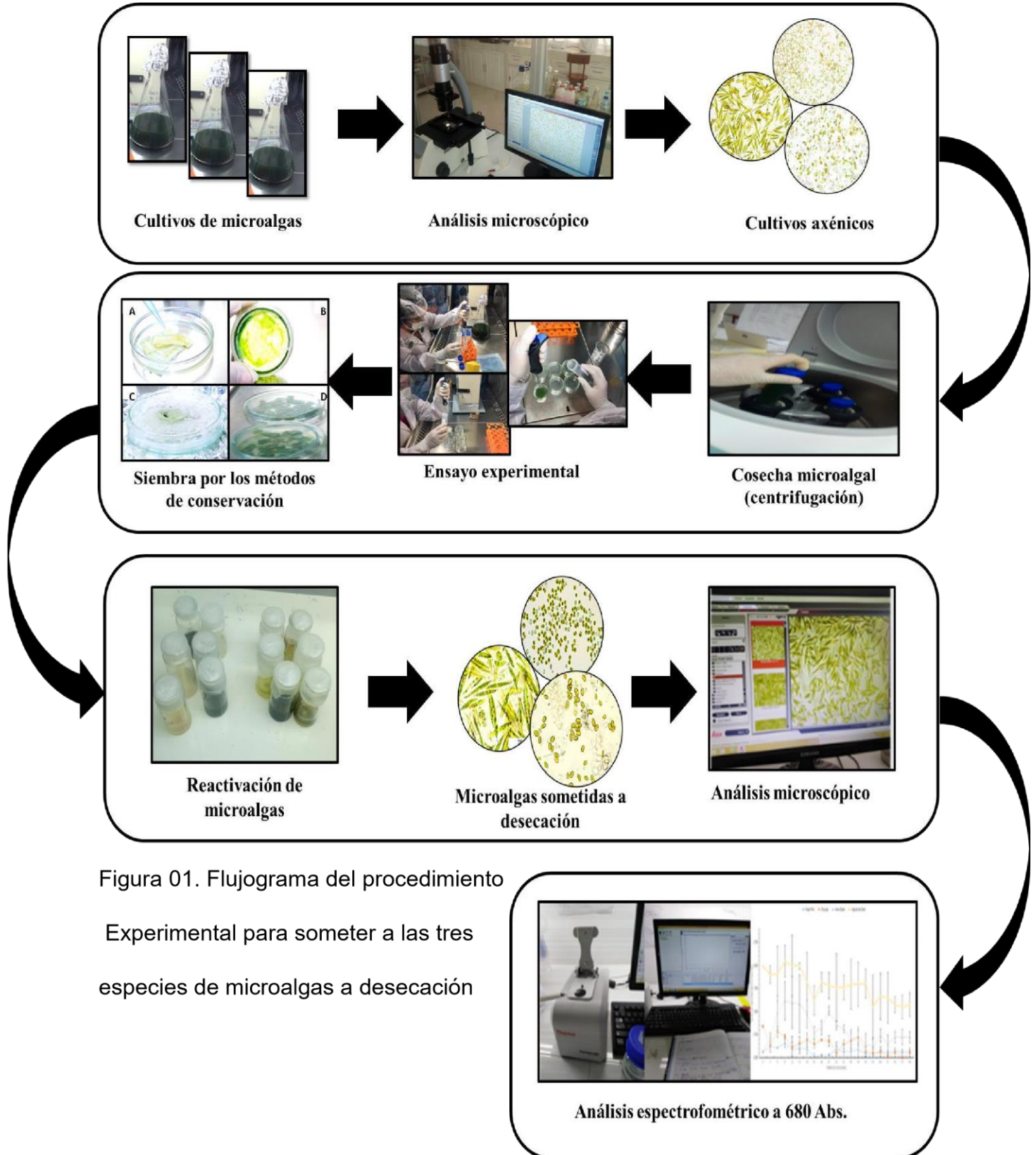


Figura 01. Flujograma del procedimiento

Experimental para someter a las tres especies de microalgas a desecación

Tabla 1. Características morfológicas de las especies de microalgas antes de someterlas a desecación

Ensayo	Cepa	Método de almacenamiento	Color	Forma	Elevación	Márgenes	Forma de Copa	Número de Células	Dimensión	Pirenoides
<i>Ankistrodesmus</i> sp		Papel Filtro	Verde amarillento	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm de ancho	-
		Silica Gel	Verde oliva	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm de ancho	-
		Arena Estéril	Verde oliva	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm de ancho	-
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm de ancho	-
<i>Scenedesmus</i> sp		Papel Filtro	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Silica Gel	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
<i>Chlorella</i> sp		Papel Filtro	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Arena Estéril	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-

30	<i>Ankistrodesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Silica Gel	Verde	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Arena Estéril	Verde	Fusiforme	Elevada	Entera	-	3 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
	<i>Scenedesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Silica Gel	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
	<i>Chlorella</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Arena Estéril	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-

60	<i>Ankistrodesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Silica Gel	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Arena Estéril	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 µm de largo / 2 a 4 µm ded ancho	+
	<i>Scenedesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Silica Gel	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Arena Estéril	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
	<i>Chlorella</i> sp	Papel Filtro	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Arena Estéril	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5µm	-

Tabla 2. Variaciones morfológicas de las especies de microalgas después de someterlas a desecación

Ensayo	Cepa	Método de almacenamiento	Color	Forma	Elevación	Márgenes	Forma de Copa	Número de Células	Dimensión	Pirenoides
15	<i>Ankistrodesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde amarillento	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	10 a 17.9 μm de largo / 2 a 4 μm de ancho	+
		Silica Gel	Verde oliva	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	6 a 18 μm de largo / 3 μm de ancho	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	10 a 24 μm de largo / 2 a 4 μm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	12 a 26 μm de largo / 2 a 4 μm de ancho	+
	<i>Scenedesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 μm de largo/ 3 μm de ancho	-
		Silica Gel	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 15 μm de largo/ 5 a 8 μm de ancho	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 μm de largo/ 5 μm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 μm de largo/ 5 μm de ancho	-

30	<i>Chlorella</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	4.97 a 6. μ m de diámetro	-
		Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	5.3 a 6.47 μ m de diámetro	-
		Arena Estéril	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 6 μ m de diámetro	-
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	4 a 7 μ m de diámetro	-
	<i>Ankistrodesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Fusiforme	Elevada	Entera	-	Unicelular	10 μ m de largo / 3 μ m de ancho	+
		Silica Gel	Verde	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	6 a 18 μ m de largo / 3 μ m de ancho	+
		Arena Estéril	Verde	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	12 a 24 μ m de largo / μ m de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 4 células	10 a 20 μ m de largo / 2 a 4 μ m de ancho	+
	<i>Scenedesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	6 μ m de largo/ 4 μ m de ancho	+
		Silica Gel	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	4.95 μ m de largo/ 3.7 μ m de ancho	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	5 μ m de largo/ 7 μ m de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 μ m de largo/ 5 μ m de ancho	+

60	<i>Chlorella</i> sp	Papel Filtro	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 5 µm de diámetro	+
		Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	4 a 8 µm de diámetro	+
		Arena Estéril	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 6 µm de diámetro	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	4 a 10 µm de diámetro	+
	<i>Ankistrodesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	2 - 3 células	10 a 17 µm de largo / 2 a 4 µm de ancho	+
		Silica Gel	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	Unicelular	12 µm de largo / 3 µm de ancho	+
		Arena Estéril	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	Unicelular	10 µm de largo / 2 µm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Fusiforme	Elevada	Entera	-	Unicelular	7 µm de largo / 3 µm de ancho	+
	<i>Scenedesmus</i> sp	Papel Filtro	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 a 17 µm de largo/ 3µm de ancho	+
		Silica Gel	Verde oliva	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 células	9 a 12 µm de largo/ 5 a 8 µ de ancho	+
		Arena Estéril	Verde	Oblicuo	Convexa	Entera	-	2 - 4 células	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+
		Alginato de Sodio	Verde amarillento	Oblicuo	Convexa	Entera	-	Unicelular	8 µm de largo/ 5µm de ancho	+

<i>Chlorella</i> sp	Papel Filtro	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	2 a 3 μ m de diámetro	+
	Silica Gel	Verde oliva	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	6 a 8 μ m de diámetro	+
	Arena Estéril	Verde	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	4 a 6 μ m de diámetro	+
	Alginato de Sodio	Verde amarillento	Circular	Convexa	Entera	+	Unicelular	3 a 5 μ m de diámetro	+

Figura 08 y 09. Cultivo y cosecha de las microalgas

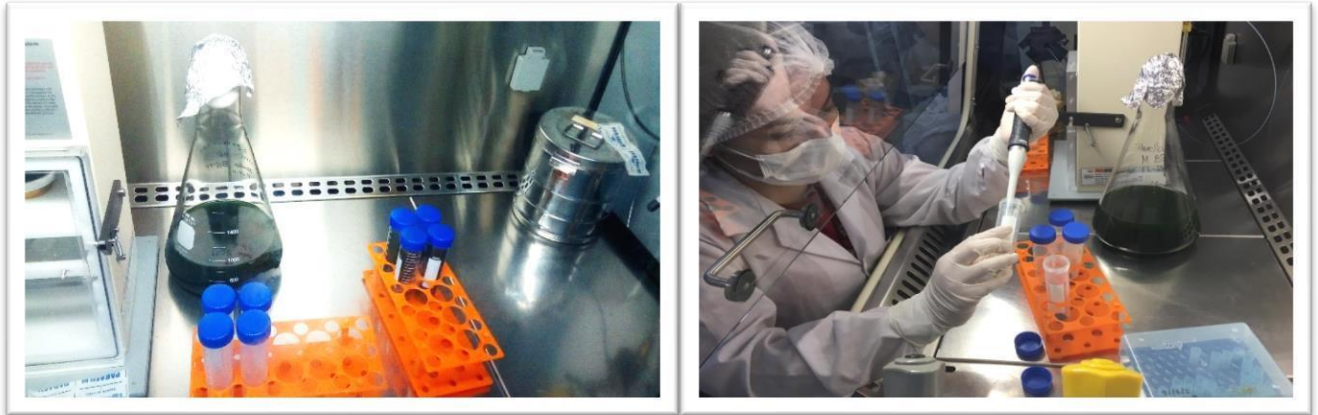


Figura 10. Siembra por los métodos de desecación (A= Papel filtro, B= Silica gel, C=Arena Estéril y D= Matriz de Alginato de Sodio).

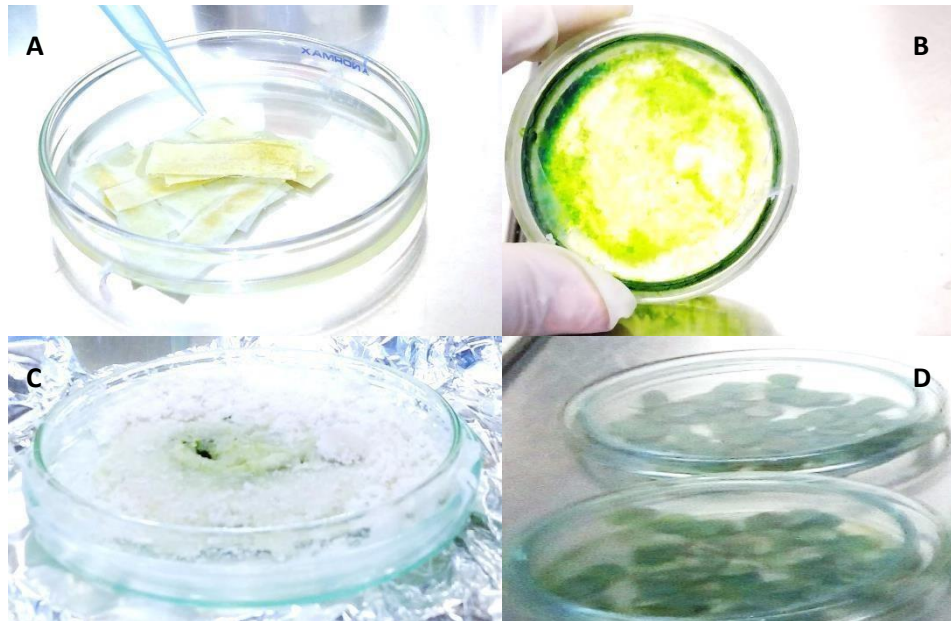


Figura 11. Ensayo experimental

