



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE CHLORELLA SP Y NOSTOC
SP EN ZEA MAYS L. EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingeniero en Biotecnología**

**AUTORES: BELICA SALAZAR JORGE ALEJANDRO
SUÁREZ GAIBOR MATEO ALEJANDRO
TUTOR: EDISON ANTONIO OSORIO MUÑOZ**

Quito-Ecuador

2025

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Jorge Alejandro Belica Salazar con documento de identificación N°. 1750018424 y Mateo Alejandro Suarez Gaibor con documento de identificación N°. 1723425854; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

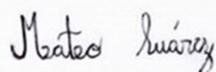
Quito, 18 de marzo del año 2025

Atentamente,



Jorge Alejandro Belica Salazar

CI: 1750018424



Mateo Alejandro Suarez Gaibor

CI: 1723425854

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Jorge Alejandro Belica Salazar con documento de identificación N°. 1750018424 y Mateo Alejandro Suarez Gaibor con documento de identificación N°. 1723425854, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de un biofertilizante a base de *Chlorella* sp y *Nostoc* sp en *Zea mays* L. en condiciones de laboratorio.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

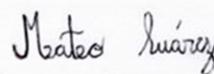
Quito, 18 de marzo del año 2025

Atentamente,



Jorge Alejandro Belica Salazar

CI: 1750018424



Mateo Alejandro Suarez Gaibor

CI: 1723425854

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Edison Antonio Osorio Muñoz con documento de identificación N° 1720048170 docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE CHLORELLA SP Y NOSTOC SP EN ZEA MAYS L. EN CONDICIONES DE LABORATORIO, realizado por Jorge Alejandro Belica Salazar con documento de identificación N°. 1750018424 y Mateo Alejandro Suarez Gaibor con documento de identificación N°. 1723425854, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 18 de marzo del año 2025

Atentamente,



Ing. Edison Antonio Osorio Muñoz

CI: 1720048170

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a mis padres, abuelos, hermanas y mis gatos. Gracias a su apoyo incondicional en todo este tiempo de carrera me permitió seguir adelante a pesar de cualquier adversidad, agradezco inmensamente todas las enseñanzas que me impartieron para lograr ser quién soy hoy, este logro no hubiera sido posible sin la ayuda de cada uno de ellos y de todas las personas que aportaron un granito de arena en este proceso largo.

- Mateo Alejandro Suárez Gaibor

Dedico mi trabajo de titulación a mi madre, hermano y parientes cercanos que han formado parte de mi desarrollo integro como persona y como profesional, apoyándome y dándome las herramientas necesarias para cumplir con mis metas propuestas.

- Belica Salazar Jorge Alejandro

AGRADECIMIENTOS

De antemano deseo agradecer a mi hermano y mi madre que han conformado mi desarrollo personal, ético, moral, y profesional siendo los principales pilares que me han impulsado a superarme y jamás darme por vencido, quiero agradecer a mi novia que me ayudo en todo momento, y hacer un especial reconocimiento al Ing. Daniel Alberto Freire Balseca ya que sin el no hubiera sido posible el desarrollo del tema pertinente para el presente trabajo de titulación.

- Belica Salazar Jorge Alejandro

RESUMEN

En el presente trabajo de titulación se evaluó el efecto de un biofertilizante elaborado a partir de la microalga *Chlorella* sp y de la cianobacteria *Nostoc* sp aplicado al cultivo de maíz (*Zea mays* L.), con el objetivo de medir su efectividad tanto en la germinación como en el desarrollo de plántulas. Para el cultivo de los microorganismos se utilizaron medios de cultivo específicos: Basfoliar para *Chlorella* sp y BG11₀ para *Nostoc* sp, con variaciones en su fuente de nitrógeno con la finalidad de determinar el Medio con mayor crecimiento celular para su escalado. Posteriormente, se estableció el mejor método de separación de biomasa de cada especie para su uso en los tratamientos aplicados al maíz. Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con el biofertilizante a base de *Chlorella* sp y *Nostoc* sp presentó los mayores valores medios en la altura de la planta, altura de hojas, número de hojas, tamaño de raíz principal y número de raíces totales, en comparación con el control químico y otros tratamientos. Los resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado los beneficios de utilizar microalgas como biofertilizantes en cultivos agrícolas. El biofertilizante a base de *Chlorella* sp. y *Nostoc* sp. tuvieron un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz, lo que podría representar una alternativa sostenible a los fertilizantes químicos convencionales.

Palabras clave: cianobacteria, biofertilizante, microalga, biomasa, escalado.

ABSTRACT

In the present titration work, the effect of a biofertilizer made from the microalgae *Chlorella* sp and the cyanobacterium *Nostoc* sp applied to the cultivation of corn (*Zea mays* L.) was evaluated, with the objective of measuring its effectiveness in both germination. as in the development of seedlings. For the cultivation of microorganisms, specific culture media were used: Basfoliar for *Chlorella* sp and BG110 for *Nostoc* sp, with variations in its nitrogen source to determine the medium with the greatest cell growth for its climbing. Subsequently, the best biomass separation method of each species was developed for use in the treatments applied to corn. The results obtained indicated that the treatments with the biofertilizer based on *Chlorella* sp and *Nostoc* sp presented the highest average values in plant height, leaf height, number of leaves, main root size and number of total roots, in comparison with chemical control and other treatments. The results agree with previous studies that have demonstrated the benefits of using microalgae as biofertilizers in agricultural crops. The biofertilizer based on *Chlorella* sp. and *Nostoc* sp. had a positive effect on the growth and development of corn plants, which could represent a sustainable alternative to conventional chemical fertilizers.

Keywords: cyanobacteria, biofertilizer, microalgae, biomass, scaling

Contenido

1. Introducción	1
2. Fundamentación teórica	4
2.2. <i>Chlorella</i> sp.	5
2.2.1. Aplicaciones para <i>Chlorella</i> sp.....	6
2.2.2. Condiciones de cultivo para <i>Chlorella</i> sp.....	6
2.3. <i>Nostoc</i> sp.	7
2.3.1. Reproducción de <i>Nostoc</i> sp.	9
2.3.2. Aplicaciones de <i>Nostoc</i> sp.	10
2.3.3. Condiciones de cultivo para <i>Nostoc</i> sp.	11
2.4. Medios de cultivo	12
2.4.1. Medio de cultivo para <i>Chlorella</i> sp.....	12
2.4.2. Medios de cultivo para <i>Nostoc</i> sp.....	13
2.5. Cultivo <i>Zea Mays</i> L.	13
2.5.1. Fertilizantes químicos usados en la actualidad para el cultivo de <i>Zea mays</i> L.	14
2.6. Biofertilizantes	15
2.7. Métodos de separación de biomasa	16
3. Materiales y métodos	17
3.1. Material biológico (Muestras).	17
3.2. Identificación.....	17
3.3. Elaboración de medios de cultivo.....	17
3.4. Siembra de <i>Chlorella</i> sp.	18
3.5. Siembra de <i>Nostoc</i> sp.	18
3.6. Conteo celular.....	19
3.7. Escalado de los Cultivos.....	20
3.7.1. Escalado de <i>Chlorella</i> sp.	20
3.7.2. Escalado de <i>Nostoc</i> sp.....	21
3.8. Separación de biomasa	22
3.9. Inoculación de semillas de <i>Zea mays</i> L. a diferentes tratamientos.....	23
3.9.1 Selección de semillas.....	23
3.9.2. Protocolo de desinfección de semillas.....	24
3.9.3. Pretratamiento en biomasa de <i>Nostoc</i> sp.	24
3.9.4. Tratamientos aplicados a semillas de maíz.....	25
3.10. Variables de evaluación.....	25
4. Resultados y discusión	27
4.1. Identificación de <i>Chlorella</i> sp.	27
4.2. Identificación de <i>Nostoc</i> sp.....	27
4.3. Aislamiento de las muestras de <i>Chlorella</i> sp.....	28
4.4. Aislamiento de las muestras de <i>Nostoc</i> sp.....	29
4.5. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.....	31

4.6.	Crecimiento de <i>Nostoc</i> sp.	33
4.7.	Métodos de separación.	34
4.7.1.	Centrifugación	34
4.7.2.	Decantación.	36
4.7.3.	Filtración.....	36
4.7.2.	Cuadro comparativo de técnicas implementadas en la separación de biomasa.	37
4.8.	Inoculación de semillas con diferentes tratamientos.	38
4.9.	Índice de Germinación.....	39
4.10.	Análisis de Varianza y pruebas de Tukey.....	39
4.10.1.	Análisis estadístico de la germinación de semillas	39
4.10.2.	Análisis estadístico del crecimiento de las plántulas.	41
4.10.3.	Análisis estadístico del crecimiento de número de hojas.	42
4.10.4.	Análisis estadístico del tamaño de hojas.	43
4.10.5.	Análisis estadístico del número de raíces.	44
4.10.6.	Análisis estadístico del tamaño de la raíz principal.....	45
4.11.	Resultados gráficos de siembra.	47
5.	Conclusiones	49
6.	Recomendaciones	51
7.	Bibliografía	52
8.	Anexos	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Superficie agrícola en donde se utilizan químicos	2
Figura 2. Vista microscópica de <i>Chlorella</i> sp.	5
Figura 3. Vista microscópica de <i>Nostoc</i> sp.	8
Figura 4. Balón pírex de 12L escalado con <i>Chlorella</i> sp (Sistema (FBR) Fuente: (Los autores, 2024).	21
Figura 5. Método de Flotación en semillas de maíz	24
Figura 6. Imagen en aumento 40x de <i>Chlorella</i> sp.	27
Figura 7. Vista de <i>Nostoc</i> sp en aumento 40x	28
Figura 8. Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp en medio Basfoliar sólido y Basfoliar + Urea	29
Figura 9. Placa con crecimiento variado de cianobacterias provenientes de la biomasa de <i>Nostoc</i> sp.	30
Figura 10. Biomasa de <i>Nostoc</i> sp en crecimiento en caja Petri.....	31
Figura 11. Cinética de crecimiento en volumen inicial de (150mL).	32
Figura 12. Cinética de crecimiento en volumen de (250mL)	32
Figura 13. Cinética de crecimiento en balón de 12L.	33
Figura 14. Biomasa aislada de la cianobacteria <i>Nostoc</i> sp. (A) Imagen tomada de estereoscopio (B) Imagen de microscopio óptico en aumento 40x (C) Imagen de microscopio óptico en aumento 100x.	34
Figura 15. Fases de sedimentación en la decantación de <i>Chlorella</i> sp.	36
Figura 16. Matraz Kitasato con bomba de vacío empleado en filtración.	37
Figura 17. Germinación de las semillas.....	39
Figura 18 ANOVA de la germinación de semillas	40
Figura 19. Prueba de Tukey en germinación de semillas	40
Figura 20. Análisis de Varianza de un factor para el desarrollo de la plántula	41
Figura 21 Prueba Tukey en altura de plántulas	41
Figura 22. ANOVA de # Hojas	42
Figura 23. Prueba Tukey en # de Hojas.....	42
Figura 24. ANOVA de tamaño de hojas.....	43
Figura 25. Prueba de Tukey para el tamaño de hojas.	44
Figura 26. ANOVA del número de raíces	44
Figura 27. Prueba de Tukey en número de Raíces	45
Figura 28. ANOVA del Tamaño de la Raíz	46
Figura 29. Prueba de Tukey en Tamaño de Raíz principal.....	46
Figura 30. Resultado gráficas de cada caja en función a los diferentes tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 según el (A) Crecimiento altura de la plántula (B) Numero de Hojas (C) Altura de Hojas (D) Tamaño de Raíz y (E)Número de Raíces	47
Figura 31. Matraces con la cepa previamente aislada en laboratorio de <i>Chlorella</i> sp.	57
Figura 32. Medición de pH del medio de cultivo Basfoliar con potenciómetro.....	57
Figura 33 Medición de pH del medio de cultivo BG11 con potenciómetro.....	58
Figura 34. Medición de pH del fertilizante químico 10-30-10 utilizado en los tratamientos.	58
Figura 35. Recolección en campo de la biomasa de <i>Nostoc</i> sp.	59
Figura 36. Siembra inicial de semillas con los biofertilizantes.	59
Figura 37 Germinación de semillas en el cuarto día.....	60
Figura 38. Semillas germinadas e inicio de plántulas al 7mo día.....	60
Figura 39. Medición de plántulas desarrolladas al 7mo día	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Chlorella</i> sp.....	6
Tabla 2. Taxonomía de <i>Nostoc</i> sp.	8
Tabla 3: Contenido de nutrientes del medio Basfoliar	12
Tabla 4. Contenido de nutrientes del medio BG11 (Modificado)	13
Tabla 5. Efectos de los fertilizantes agroquímicos	14
Tabla 6. Medios de cultivo para la siembra de microalgas.....	18
Tabla 7. Tratamientos de centrifugación	22
Tabla 8. Tratamientos para medir índice de germinación.	25
Tabla 9. Rendimiento de separación de biomasa mediante centrifugación	35
Tabla 10. Comparación de métodos de separación de biomasa	38
Tabla 11. Descripción de Tratamientos.....	38

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Conteo celular (Sedgewick-rafter).....	19
Ecuación 2. Conteo Celular (Neubauer).....	19
Ecuación 3. Rendimiento de centrifugación.....	22
Ecuación 4 % Germinación de semillas	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de Matraces Erlenmeyer con crecimiento de Chlorella sp.....	57
Anexo 2. Medición de pH	57
Anexo 3. Medio BG11	58
Anexo 4. Fertilizante químico 10-30-10.....	58
Anexo 5. Recolección de la biomasa de Nostoc sp	59
Anexo 6. Siembra con los diferentes tratamientos.	59
Anexo 7. Inicio de germinación en los diferentes tratamientos al 4to día.....	60
Anexo 8. Semillas germinadas al 7mo Día.....	60
Anexo 9 Evaluación de plántulas sometidas a diferentes tratamientos.	61

1. Introducción

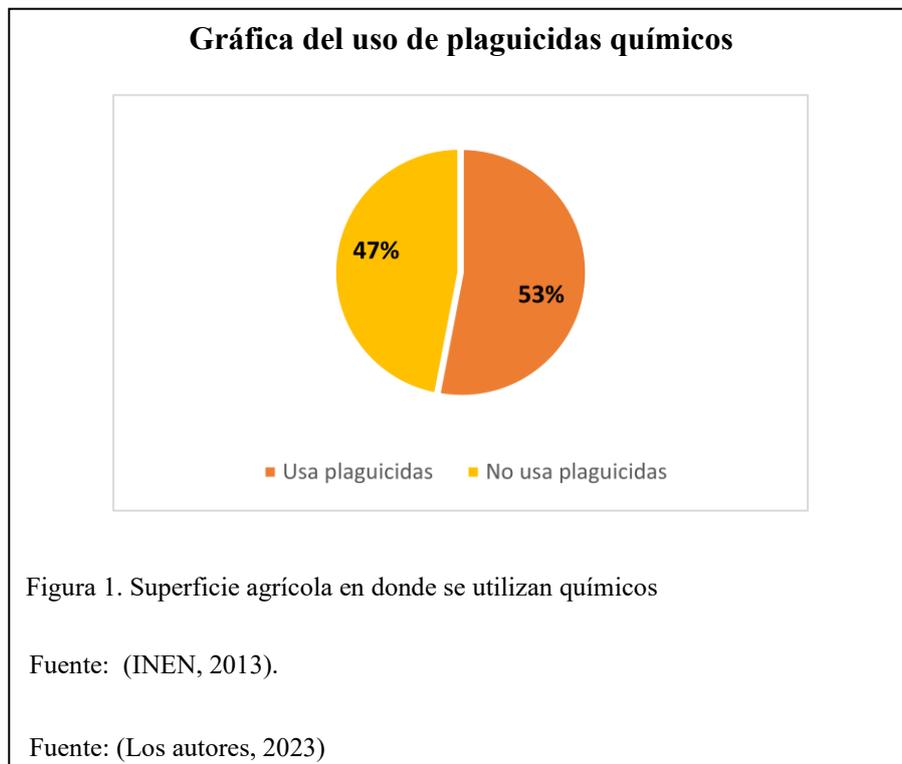
El uso indiscriminado de agroquímicos y fertilizantes sintéticos representa uno de los principales problemas agronómicos en la actualidad, provocando efectos negativos tanto al medio ambiente como en la salud humana (García Vásquez et al., 2023). Entre los impactos ambientales se destacan la degradación ecológica, zonas muertas en los océanos, eutrofización, infertilidad del suelo y pérdida de biodiversidad. En cuanto a la salud humana, se ha observado y evidenciado que el uso prolongado de agroquímicos afecta a agricultores, técnicos y residentes cercanos a las áreas de aplicación (Reyes Palomino & Cano Ccoa, 2022)

La utilización de agroquímicos en Ecuador, de forma especial los que combaten las plagas es una situación de preocupación. Se han observado varios contextos que lo corroboran, como el aumento gradual de su uso, los efectos negativos en el medio ambiente y la salud, la falta de información sobre su aplicación, la insuficiente supervisión, el riesgo de sobredosificación y la deficiente gestión de los residuos (Naranjo, 2020).

En el Ecuador el consumo de agroquímicos se ha incrementado desde el año 2000 en adelante. Los agricultores utilizan los plaguicidas sin tener un conocimiento o capacitación sobre la manipulación segura de estas sustancias; además solo el 12% de las hectáreas de cultivos permanentes y 10% de cultivos transitorios conocen los niveles de la toxicidad (Aveiga Ortiz et al., 2021).

Es oportuno resaltar, que en Ecuador se registró una importación de pesticidas de 214.764 toneladas entre los años 2008 y 2015, con un valor equivalente a 1.608 millones de dólares. Además, durante el periodo de 2006 a 2010 se observó un aumento significativo en el uso de agroquímicos llegando a cuadruplicar las toneladas por hectárea de siembra, alcanzando en el año 2010 una alarmante cifra del uso de 6.35kg de plaguicidas por habitante (Muentes-Rodríguez et al., 2023).

Alrededor de 1'320.988,67 hectáreas de superficie agrícola para la producción utilizan algún tipo de plaguicida, mientras que el restante se cultiva de manera ecológica (INEN, 2013). Como se puede observar en la Figura 1. Cabe resaltar, que los productos agroquímicos representan alrededor del 22% del costo total de producción de los insumos agrícolas, debido al alto precio de insecticidas, fungicidas, herbicidas, fertilizantes y otros productos que ingresan al país con aumentos de precios desde el exterior (APCSA, 2021).



Como alternativa para reducir el uso de los fertilizantes químicos, se propone el empleo total o parcial de biofertilizantes que contienen microorganismos vivos o componentes derivados de los mismos como lo son las microalgas. Estos biocompuestos tienen la habilidad de optimizar las características biológicas y químicas del suelo, también pueden restituir su fertilidad y estimular positivamente el crecimiento de las plantas, logrando fomentar una agricultura sostenible siendo respetuosos con el ambiente (Jacob-Lopes et al., 2020).

La biomasa de microalgas posee varios aminoácidos que promueven el crecimiento de las plantas, así como fitohormonas que incrementan la productividad de los cultivos al aportar macro y micronutrientes que son aprovechados por las plantas, permitiendo el desarrollo de raíces secundarias (Maldonado Venegas, 2023). Además, se ha evidenciado que el uso de la biomasa de estos microorganismos puede reducir el desarrollo de numerosos hongos fitopatógenos, debido a que fortalece las barreras físicas de las plantas, por lo que es más difícil para los organismos patógenos ingresar a su sistema (Viana, 2022). El uso de microalgas como biofertilizantes se fundamenta en una amplia gama de investigaciones que revelan sus múltiples beneficios que fomentan la agricultura sostenible (Coronado-Reyes et al., 2020).

Estudios previos han destacado la capacidad única de las microalgas para fijar nitrógeno atmosférico, transformándolo en una fuente accesible de este nutriente que es esencial para las plantas (Torres & Herrera, 2024). Adicionalmente, las microalgas liberan progresivamente otros compuestos como, fósforo, potasio y oligoelementos, que contribuyen a mejorar la fertilidad del suelo de manera natural y equilibrada (González-Pérez et al., 2022).

En base a los datos presentados, nace el interés de utilizar los biofertilizantes a base de microalgas como una alternativa sostenible con el medio ambiente en comparación con los fertilizantes químicos (Chico-Ruíz, 2023). Una de las cualidades más grandes que aportan las microalgas es la mejora en la productividad agrícola al favorecer el nicho microbiológico del suelo y reducir la contaminación ambiental por el uso de fertilizantes químicos (Rad et al., 2022).

Este estudio tiene como objetivo principal desarrollar un biofertilizante utilizando microalgas, como una alternativa a los agroquímicos que generan impactos ambientales negativos, amenazan la salud humana y el ecosistema. Además, el proyecto busca abordar la

problemática del aumento alarmante de los precios de agroquímicos, lo cual ha influido negativamente en la rentabilidad de los cultivos.

2. Fundamentación teórica.

- **Microalgas**

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos con capacidad de captar y utilizar CO₂ en sus procesos metabólicos (Zheng et al., 2020) . También contribuyen a la reducción de gases de efecto invernadero (Mountourakis et al., 2021), poseen una biomasa rica en nutrientes y pueden utilizarse en la agricultura porque controlan la deficiencia de nitrógeno en las plantas y favorecen el crecimiento de los cultivos mediante distintos mecanismos como el aporte de nutrientes de forma asimilable para las plantas (Arizmendi Martínez et al., 2023).

Las microalgas tienen potencial muy extenso y versatilidad que constituyen recursos genéticos para estudios de biodiversidad y de biotecnología en el aspecto de cubrir y poder resolver muchos problemas actuales en diversas áreas de la industria como la alimentaria, farmacéutica, acuícola, agrícola, entre otras. El interés que se ha generado sobre ellas y sus aplicaciones es claramente revolucionario. Hoy en día incluso es posible ver la existencia de empresas direccionadas en su totalidad al desarrollo e implementación de estos microorganismos a gran escala (Maldonado Venegas, 2023).

- **Cianobacterias**

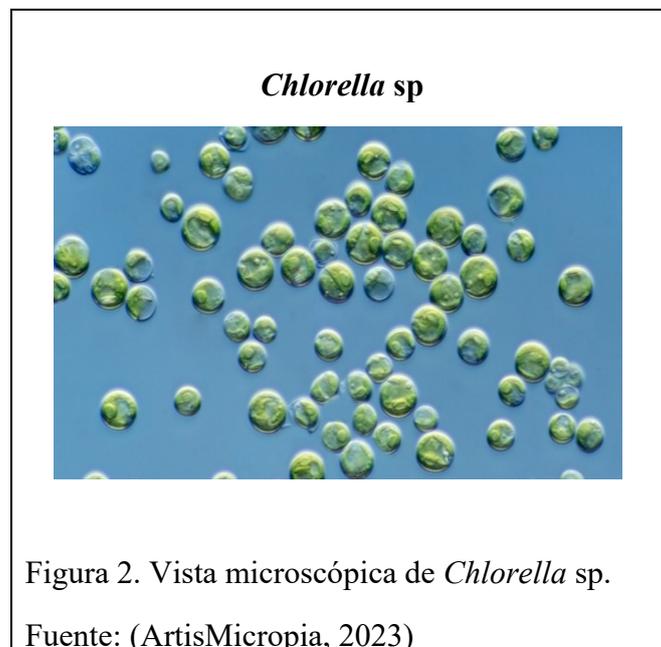
Las cianobacterias son microorganismos procariontes que pertenecen al dominio *Bacteria*, por su organización estructural y bioquímica se las sitúa en el grupo de las bacterias Gram – negativas. Posee características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas

superiores entrando en la descripción y caracterización como un tipo de microalga (Palacio Gómez et al., 2019).

Estos microorganismos realizan fotosíntesis aeróbica; que contribuye a la producción de oxígeno, introducción de nitrógeno atmosférico al agua, entre otros papeles fundamentales para el ecosistema, se considera uno de los organismos más antiguos del planeta y se encuentran presentes en casi todos los cuerpos de agua existentes (Bonillas et al., 2021).

2.2. *Chlorella* sp.

Este tipo de microalga es descrita por Santaclara, (2017) caracterizándola principalmente por ser de tipo verde unicelular, presentando una estructura celular eucariota de forma esférica y con un tamaño aproximado comprendido entre 1 y 12 μm como se la puede apreciar en la Figura 2, esta especie tiene la capacidad de desarrollarse tanto en agua dulce como en agua salada y su mecanismo de reproducción es por la vía asexual en donde cada célula madre madura produce de 4 a 8 esporas (García Vásquez et al., 2023).



- **Taxonomía**

Como se puede observar en la Tabla 1 podemos encontrar la descripción taxonómica de *Chlorella* sp la cual es un género de microalgas unicelulares pertenecientes al filo Chlorophyta, clase Trebouxiophyceae y orden Chlorellales. Las principales especies reconocidas son: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella loboehora* y *Chlorella sorokiniana*.

Tabla 1. Taxonomía de *Chlorella* sp.

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
División	Chlorophyta
Clase	Trebouxiophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>

Fuente: (Infante et al., 2012).

2.2.1. Aplicaciones para *Chlorella* sp.

El género *Chlorella* es de gran interés porque diversos estudios han mostrado que puede ayudar en la fijación del nitrógeno, mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo, y producir sustancias que promueven el desarrollo de la planta y el control de infecciones Ortiz-Moreno et al., (2019). Por esta razón, las microalgas del género *Chlorella* representan una alternativa viable para la biofertilización, generando beneficios no solo para la producción agrícola sino también para el medio ambiente (Ortiz-Moreno et al., 2020).

2.2.2. Condiciones de cultivo para *Chlorella* sp.

En función a lo revisado por Arizmendi Martínez et al., (2023), se establece que esta variedad de microalga necesita condiciones químicas particulares, como niveles específicos de nitrógeno, fósforo y azufre. Además, se requiere una estabilidad en el pH y una serie de factores físicos esenciales que se detallan a continuación:

- **Luz**

En 2002 y 2005 Mora et al.; observaron que *Chlorella* fue capaz de crecer en un rango de intensidad de luz de 581 y 576 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, sin embargo, agregan que a bajas intensidades de luz la especie tiene un mejor rendimiento fotosintético que a intensidades de luz altas. Pasado el punto de saturación de la luz, se alcanza el punto de foto inhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

- **pH**

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo, puesto que las microalgas muestran una dependencia respecto al pH del medio de cultivo variando su respuesta a este parámetro según la especie de microalga. En este caso *Chlorella* sp, presenta un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 8) (Ramos & Pizarro, 2018).

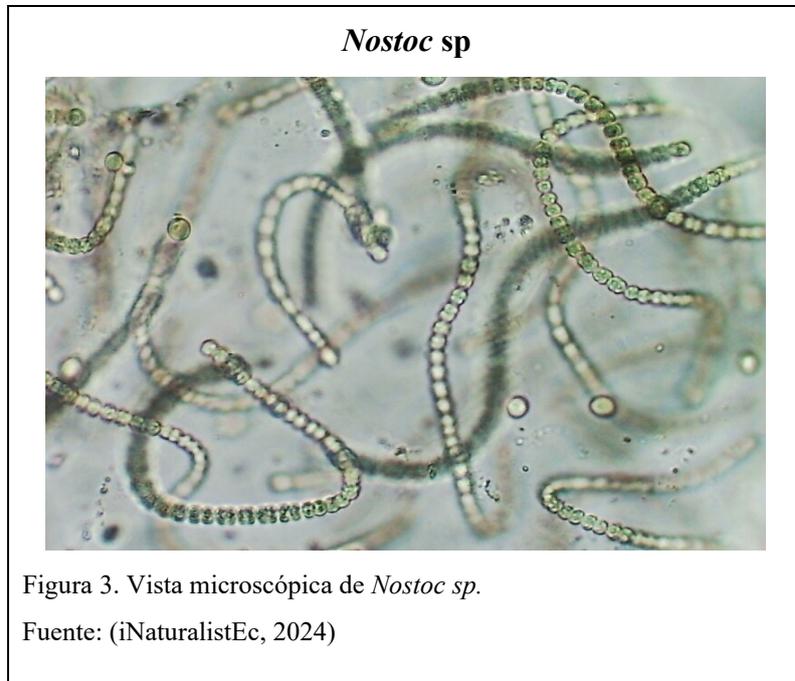
- **Temperatura**

Para la mayoría de las microalgas, el rango óptimo de temperatura se sitúa entre los 18° y 25°C y para las microalgas más resistentes como *Chlorella* estos valores llegan hasta los 36°C (Ramos & Pizarro, 2018). Además, autores como Hernández-Pérez & Labbé, (2014), señalan que una condición por encima de la temperatura óptima produce un aumento en la fotorrespiración causando la reducción de la productividad global.

2.3. Nostoc sp.

Nostoc sp es una cianobacteria de agua dulce o terrestre, se caracteriza por formar colonias esféricas y está compuesta de filamentos ligados por un mucilago firme (iNatura, 2024), puede presentar un color azul verdoso o verde oliva como se observa en la Figura 3, *Nostoc* se caracteriza por su abundancia de células fijadoras de nitrógeno y una doble capa de

células de supervivencia. Estos componentes son dos veces más grandes que la célula vegetativa de *Nostoc* (Mendoza, 2021).



- **Taxonomía**

Aunque la descripción de *Nostoc* se remonta 400 años d.C. en una dinastía Jin oriental, el término fue acuñado por Aureo Phillipis, científico, filósofo y alquimista. Etimológicamente, significa Nasenloch = Orificio nasal (Mendoza, 2021). Taxonómicamente, *Nostoc* pertenece al Dominio Bacteria, Filo Cianobacterias como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Taxonomía de *Nostoc* sp.

Reino	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Cyanobacteria</i>
Subclase	<i>Nostocophycidae</i>
Clase	<i>Cyanophyceae</i>
Orden	<i>Nostocales</i>
Familia	<i>Nostocaceae</i>
Género	<i>Nostoc</i>

Fuente: (Infante, 2012).

- **Hábitat**

Pueden vivir a temperaturas bajo cero, se les encuentra sobre los 3900 m s.n.m. hasta los 5000 m s.n.m. donde el oxígeno es escaso en la atmósfera. Son resistentes a la radiación ultravioleta, siendo favorable para su fotosíntesis. Cuando no hay lluvia, se empiezan a secar porque disminuye el nivel del agua donde habitan, permaneciendo en estado latente hasta que vuelve a llover haciendo que se rehidraten, en Ecuador se las encuentra en los páramos andinos (Cadena et al., 2013).

2.3.1. Reproducción de *Nostoc* sp.

La especie *Nostoc* sp., no puede reproducirse sexualmente, si no que utiliza únicamente la reproducción vegetativa, la cual se puede llevar a cabo mediante diferentes mecanismos:

- **Fragmentación**

En este mecanismo, las células del filamento se rompen de manera mecánica o fisiológicamente, dando lugar a pequeños fragmentos, cada uno con la capacidad de originar una nueva colonia independiente (Bonillas et al., 2021). Este proceso surge como una estrategia alternativa para subsistir.

- **Acinetos**

Cuando se presentan condiciones ambientales desfavorables, las células del tricoma ponen en acción un mecanismo de supervivencia conocido como: formación de acinetos. Estas son esporas resistentes o de reposo que se forman a partir de la transformación de células vegetativas del tricoma, las cuales tienen una gran capacidad de resistencia al frío. Esta resistencia se debe a una pared gruesa celular y el depósito de sustancias de reserva, como es el protoplasma Sanchez Araujo et al., (2021).

- **Heterocistos**

En este proceso de reproducción, el protoplasma puede germinar formando un nuevo tricoma, la cual germina hasta lograr formar cuatro células nuevas, que se da por ruptura de su pared celular (Galetovic et al., 2017).

- **Hormogonias**

Son secciones cortas de filamento que contienen entre tres y diez células, capaces de generar nuevos individuos (Sanchez Araujo et al., 2021).

2.3.2. Aplicaciones de *Nostoc* sp.

- **Biofertilizante vegetal**

Este tipo de cianobacteria tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, captura el CO₂ libre del ambiente y los utiliza para producir compuestos bioactivos que son capaces de promover el crecimiento vegetal de las plantas (Quinto, 2021).

- **Alimentación**

Es utilizado como alimento en diversas partes del mundo, especialmente en América del Sur ya que es rico en proteínas, carbohidratos y otros nutrientes, lo que lo hace un alimento ideal para el consumo humano y animal (Quinto, 2021).

- **Fertilización de suelo**

Utilizado como fertilizante natural para mejorar la productividad y calidad del pimiento, como es el caso del humus de lombriz que contiene *Nostoc sp*, mejora la productividad y calidad del pimiento, aumentando los parámetros de producción, como el tamaño de los frutos y la calidad de estos (Cadena et al.,2013).

- **Producción de bioetanol**

Estudios anteriores como los de Herrera Pérez, (2012), muestran la producción de bioetanol con exopolisacáridos producidos por cepas de *Nostoc* sp.

2.3.3. Condiciones de cultivo para *Nostoc* sp.

Quinto Hidalgo, (2021) establece principalmente que el tipo de microalgas conocido como cianobacterias del género Nostocales han despertado un creciente interés en diversos ámbitos de la agricultura, por esta razón para aprovechar plenamente su potencial, es esencial comprender y optimizar las condiciones de cultivo tanto físico y químico que favorecen su crecimiento y metabolismo, mostrando así una lista de las principales condiciones que giran en torno al hábitat donde se encuentran:

- **Temperatura:** diferentes estudios científicos han demostrado que las cianobacterias crecen mejor a temperaturas comprendidas entre los 15°C y los 30°C, sin embargo, se ha reportado que las mayores tasas de crecimiento y reproducción se alcanzan a los 25°C que es considerada la temperatura óptima de crecimiento.
- **Oxígeno:** produce su oxígeno durante su proceso de fotosíntesis, son capaces de generar materia orgánica para otros organismos; cuando este queda atrapado en el medio de cultivo, causa un efecto desfavorable reduciendo la eficiencia fotosintética, generando inhibición en el crecimiento del microorganismo incluso a concentraciones altas de CO₂.
- **Luz:** en cultivos cerrados se recomienda usar luz artificial para el mantenimiento, ya que es posible controlarla de acuerdo con las necesidades de éste. La intensidad de luz varía con el volumen y concentración celular. Una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se considera adecuada para cultivar cianobacterias.
- **pH:** debido que influye en el crecimiento y composición bioquímica de las cianobacterias, estos organismos prefieren ambientes alcalinos con pH entre 7 y 9, debido a que están adaptadas a utilizar el bicarbonato disuelto en el agua como forma de asimilación de carbono inorgánico para el proceso fotosintético.

2.4. Medios de cultivo

Según Casá & De Escalada, (2020), un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

Se pueden clasificar de diferentes maneras como son por su consistencia (sólidos, líquidos, semisólidos), su origen (naturales, sintéticos, semisintéticos), su formulación (definidos químicamente, complejos), su preparación, su utilización y por su estado (González-Delgado et al., 2017).

2.4.1. Medio de cultivo para *Chlorella* sp.

- **Medio Basfoliar 10-4-7**

El medio Basfoliar es un fertilizante químico foliar líquido que posee macro y micronutrientes esenciales detallados en la Tabla 3, los cuales son utilizados para los cultivos agrícolas y hortícolas, este contiene nitrógeno, fósforo, potasio y oligoelementos (Tenorio & Añazco, 2022).

Tabla 3: Contenido de nutrientes del medio Basfoliar

Contenido	Nutrientes	Descripción
10,00%	N	1,0%Nitrógeno total; 0,7% nitrógeno amoniacal; 8,3% nitrógeno ureico
4,00%	P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo soluble en agua
7,00%	K ₂ O	Óxido de potasio soluble en agua
1,60%	S	Azufre total
0,01%	B	Boro
0,02%	Cu	Cobre
0,02%	Fe	Hierro
0,01%	Mn	Manganeso
0,01%	Mo	Molibdeno

Fuente: (Los autores, 2024).

2.4.2. Medios de cultivo para *Nostoc* sp.

- **Medio BG11₀**

El medio de cultivo BG11₀ está compuesto por diversas sales descritas en la Tabla 4, se utiliza para el cultivo de algas de agua dulce (cianobacterias), este medio de cultivo es carente de nitrógeno y es utilizado principalmente con fines de docencia e investigación (Rippka et al., 1979).

Tabla 4. Contenido de nutrientes del medio BG11 (Modificado)

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,03
MgSO ₄	0,075
CaCl ₂	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato de amonio	0,006
Na ₂ CO ₃	0,02
EDTA	0,001

Fuente: (Los autores, 2024).

2.5. Cultivo *Zea Mays* L.

El maíz (*Zea mays* L.) tiene la característica de que puede ser utilizado como alimento tanto como para personas o animales, en cualquier etapa del desarrollo de la planta o su producción permitiéndole ser una especie que genera gran demanda gracias a su amplia variedad de productos y procesos industriales implícitos (Guamán Guamán et al., 2020).

La producción de maíz es cada vez mayor en los cultivos nacionales, ya que las semillas híbridas de alto rendimiento permiten a los agricultores tener una mejor productividad en una misma superficie (Guamán Guamán et al., 2020).

Para el correcto desarrollo del cultivo del maíz se debe tener en cuenta ciertas condiciones para asegurar su germinación y correcto crecimiento, la temperatura mínima para su germinación debe ser de 10°C. Habitualmente el maíz brota después de una semana, además,

no tolera encharcamiento de agua, por eso un buen drenaje es fundamental, sobre todo en zonas templadas y en suelos más pesados (Andrade et al., 2023).

El cultivo de esta planta puede ser realizado año tras año en el mismo campo, pero es importante emplear una rotación con otros cultivos para minimizar enfermedades, plagas y el crecimiento de malezas con el fin de aumentar su rendimiento. El intercambio con legumbres ayuda a reducir el uso de fertilizantes nitrogenados (Caviedes et al., 2023).

2.5.1. Fertilizantes químicos usados en la actualidad para el cultivo de *Zea mays* L.

Los agroquímicos principalmente utilizados para el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) se muestran en la Tabla 5, los cuales son indispensables para el crecimiento, desarrollo y cosecha del maíz, pero su uso constante y desmedido puede generar un impacto ambiental negativo que a futuro impedirá el crecimiento y desarrollo de nuevas cosechas, debido a la pérdida de viabilidad del suelo.

Tabla 5. Efectos de los fertilizantes agroquímicos

Fertilizante	Composición	Beneficios	Efectos nocivos	Bibliografía
NPK (15-15-16)	- Nitrógeno - Fosforo - Potasio	Para que las plantas puedan crecer y generar frutos.	- Lixiviación. - Contaminación del agua. - Contaminación de aire y suelo.	Tonatiuh Sánchez-Navarrete et al., (2021)
Urea	- Carbono - Oxígeno - Nitrógeno (46%)	- Bajo costo. - Solubilidad en agua. - Promueve el crecimiento y rendimiento de plantas.	- Acidificación del suelo. - Aplicación excesiva daña a las plantas. - Salinización del suelo.	Sandoval-Guerrero & Peña-Vélez, (2023)
Sulfato de amonio	- Sulfato - Amonio	- Alto contenido de nutrientes. - Bajo costo relativo. - Solubilidad en agua	- En altas concentraciones es tóxico para animales. - Contaminación del agua por lixiviación. - Acidificación del suelo.	Tejada et al., (2024)

Nitrato de amonio	- Nitrato - Amonio	- Alto contenido de nitrógeno - Versatilidad de aplicación. - Solubilidad en agua.	- Compuesto altamente explosivo. - Tóxico para la salud humana. - Acidificación del suelo.	Soto Pacheco & Alcántara Garduño, (2022)
Fosfato diamónico (DAP)	- Fósforo - Nitrógeno	- Económico. - Alta cantidad de N y P. - Solubilidad en agua.	- Fijación del fósforo. - Eutrofización. - Salinización del suelo.	Salazar Carranza et al., (2023)

Fuente: (Los autores, 2024).

A pesar de los diversos efectos nocivos asociados con el uso excesivo de fertilizantes sintéticos como el nitrato de amonio, el sulfato de amonio y el fosfato diamónico, su uso continúa siendo prevalente en la agricultura moderna por varias razones:

- Aumento de la productividad agrícola
- Falta de conocimiento y acceso a alternativas nuevas
- Subsidios y políticas agrícolas
- Presión para aumentar la producción debido a la demanda

2.6. Biofertilizantes

Según Gómez et al., (2022), afirma que “los bioestimulantes son compuestos que han ganado gran interés significativo como posibles alternativas a los fertilizantes sintéticos tradicionales debido a su efectividad ya reportada y demostrada en diversas investigaciones. Estos compuestos biológicos son seguros para el medio ambiente y son ricos en nutrientes”.

El uso de microalgas en la producción de biofertilizantes ha surgido como un aporte de la biotecnología y como una opción promisorio debido a su capacidad multifuncional, eficiencia fotosintética y capacidad de suministrar nitrógeno en formas disponibles para las plantas (García Vásquez et al., 2023).

Según lo expuesto por Romero Torres & Sandoval Herrera, (2024), la utilización de microalgas en la producción de biofertilizantes se considera una gran contribución de la biotecnología. Además, en estudios como el realizado por Ortiz-Moreno et al., (2020), respaldan que algunos extractos de microalgas potencian el crecimiento de los cultivos debido a los aportes antes mencionados.

2.7. Métodos de separación de biomasa

Existen varios métodos que se pueden emplear para la separación de la biomasa del medio de cultivo, entre los cuales están: centrifugación, filtración y decantación.

- **Centrifugación**

La centrifugación es un método de separación que se basa en la sedimentación acelerada, la cual emplea la fuerza centrífuga con el fin de separar los elementos de una mezcla líquida en función del tamaño de partícula y su densidad. En este contexto, este método se utiliza para la separación de la fase sólida (biomasa), de la fase líquida (medio de cultivo o suspensión) de manera eficaz (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

- **Filtración**

La filtración es una técnica de separación física que emplea un medio poroso, como un filtro, para separar sólidos de un fluido. El filtro actúa como una barrera física que permite el paso del fluido, mientras que retiene las partículas sólidas de la biomasa (Nurra et al., 2014).

- **Decantación**

Este método de separación física se basa en la diferencia de densidad entre dos fases inmiscibles, es decir que no se pueden mezclar. Una fase dispersa (biomasa) y una fase continua (líquido). Durante este proceso, las partículas de la biomasa al ser más densas se sedimentan en el fondo del recipiente, mientras que el líquido al ser más ligero queda en la parte superior (Dassey & Theegala, 2013)

3. Materiales y métodos.

El presente trabajo de investigación se realizó en la “Universidad Politécnica Salesiana”, en los laboratorios de Ciencias de la Vida, Campus Girón, Quito - Ecuador.

3.1. Material biológico (Muestras).

La cepa de la microalga *Chlorella* sp utilizada en este estudio fue obtenida del banco de cepas de los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, mientras que la cepa de la cianobacteria *Nostoc* sp fue obtenida de los carreteros de Papallacta, provincia de Napo en Ecuador.

3.2. Identificación

Para la identificación de la microalga y de la cianobacteria se utilizó un microscopio óptico, junto con ayuda de claves dicotómicas específicas para las especies en estudio.

Según la clave dicotómica descrita por Bolívar, (1999) las características para la identificación microscópica de *Chlorella* sp son: unicelulares, coloniales o filamentosas, presenta cloroplastos parietales, acopados o a veces lobulados; células elipsoidales u ovoides de 15 μm de diámetro.

En el caso de *Nostoc* sp, según la clave dicotómica descrita por Barreno & Pérez-Ortega, (2003) mencionan que, para la identificación se observan filamentos formados por células uniformemente redondeadas de color verde azulado de 3–7 μm de diámetro, con células hialinas de mayor tamaño intercaladas (heterocistes, que son las células encargadas de fijar el nitrógeno atmosférico) con aspecto de collar de perlas.

3.3. Elaboración de medios de cultivo.

La descripción de los medios implementados se encuentra detallada en la Tabla 6, estos medios de cultivo elaborados se plantean con el objetivo de comparar diferencias en el crecimiento y concentración de la biomasa sembrada en estado sólido en cajas Petri.

Tabla 6. Medios de cultivo para la siembra de microalgas

Cepa	Medio empleado	Temperatura promedio(°C)	Nº de Replicas	Fotoperiodo
<i>Nostoc sp</i>	BG11 ₀	15-20	5	12:12
	BG11 ₀ + Urea (0.20g/L)	15-20	5	12:12
<i>Chlorella sp</i>	Basfoliar	15-20	5	12:12
	Basfoliar + Urea (0.20g/L)	15-20	5	12:12

Fuente: (Los autores, 2024).

3.4. Siembra de *Chlorella sp*.

Para la siembra de la microalga *Chlorella sp*, se tomó un volumen de 1 mL del matraz Erlenmeyer del banco de cepas ya cultivada previamente en el laboratorio, se le añadió 9 mL de agua destilada estéril y se homogenizó, posteriormente se procedió a la siembra en cámara de flujo laminar para evitar contaminación, la siembra se realizó de la siguiente manera: de los 10 mL obtenidos inicialmente, mediante una micro pipeta se colocó 1 mL en cada caja Petri y se esparció mediante un asa de Drigalski.

Se sembraron 10 cajas Petri en total; 5 con Medio Basfoliar y 5 con Medio Basfoliar + Urea con el objetivo de comparar el crecimiento con respecto a la fuente de nitrógeno. Una vez sembradas las cajas Petri, se procedió a colocarlas en el estante del laboratorio con lámparas de luz, con fotoperiodo de 12 horas.

3.5. Siembra de *Nostoc sp*.

Para la siembra de la cianobacteria *Nostoc*, se tomó porciones de la muestra recolectada en campo para fragmentarlas en un mortero junto con agua destilada, posteriormente en cámara de flujo laminar se realizó la siembra con un asa de siembra metálica mediante la técnica de

estriado. Se sembraron 10 cajas Petri en total, 5 con Medio BG11₀ y 5 con Medio BG11₀ + Urea con el objetivo de comparar el crecimiento con respecto a la fuente de nitrógeno.

Una vez sembradas las cajas Petri, se procedió a colocarlas en el estante del laboratorio con lámparas de luz, con un fotoperiodo de 12 horas.

3.6. Conteo celular

En el caso de *Nostoc* sp, el conteo celular se lo realizará con el uso de la cámara de recuento Sedgewick-Rafter descrita por Rodríguez Gómez & Aké Castillo, (2019), para lo cual se empleó la fórmula descrita en la Ecuación 1.

$$DC = \frac{NoF * 1000mm^3 * Fd}{A * B * F * 1mL}$$

Ecuación 1. Conteo celular (Sedgewick-rafter)

Dónde:

NoF: Número de Filamentos contados

Fd: Factor de dilución

(A*B): 1mm²

F: # de cuadrantes en el campo óptico

En el caso del conteo para *Chlorella* sp, según la publicación realizada por Gallego Albiach et al., (2020) se detalla el procedimiento para el conteo o estimación de densidad celular mediante la cámara de recuento de Neubauer, implementando la fórmula descrita en la Ecuación 2.

$$DC = \frac{Cuadrante\ 1 + Cuadrante\ 2 + \dots}{\#\ de\ Cuadrantes\ grandes\ contados} * \frac{1\ Cuadro}{1 + 1 + 0.1mm^3} * \frac{1000mm^3}{1cm^3} * \frac{1cm^3}{1ml} * Fd$$

$$DC = Nc * 10^4 * Fd$$

Ecuación 2. Conteo Celular (Neubauer)

Dónde:

Nc: Número de células contadas por cuadrante / Cuadrantes observados

10⁴ = Volumen de la cámara

Fd = Factor de Dilución

3.7. Escalado de los Cultivos.

3.7.1. Escalado de *Chlorella* sp.

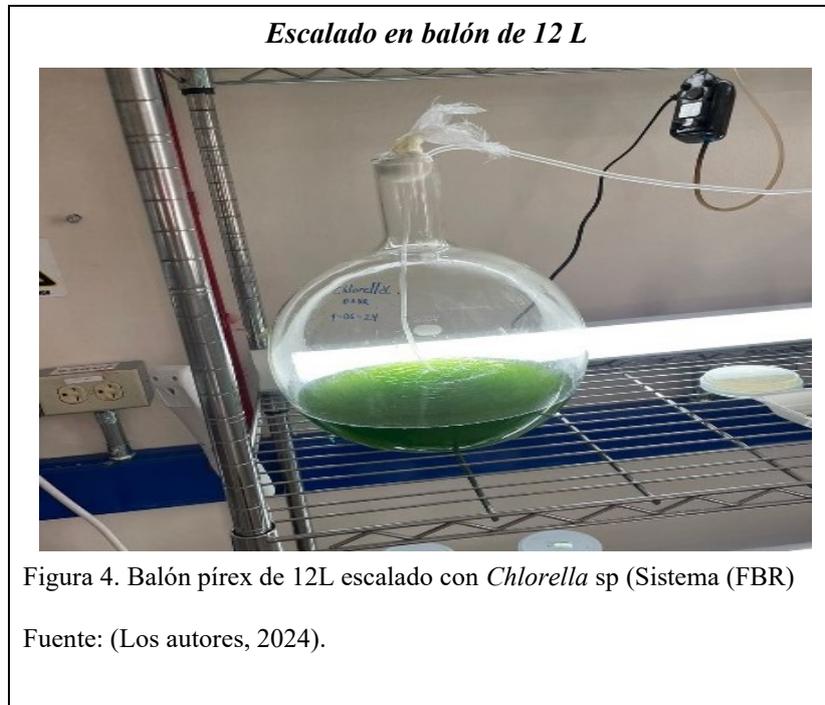
Del proceso anterior de siembra, para el escalado de *Chlorella* sp. inicialmente en una cámara de flujo laminar se tomó una colonia aislada de las cajas Petri previamente sembradas, con la ayuda de un asa bacteriológica se colocó la muestra en tubos de ensayo con 10 mL de los dos tipos de medios de cultivo (5 con medio Basfoliar y 5 con medio Basfoliar + Urea).

Luego de 4 días de crecimiento, se procedió a escalar los tubos a 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL, uno por cada Medio de cultivo utilizado. El escalado se realizó de la siguiente manera: primero se utilizó el vórtex en los tubos para homogenizar la biomasa con el medio de cultivo, posteriormente se mezclaron los 5 tubos (50 mL) de cada tipo de Medio de cultivo en 2 matraces diferentes, (Un matraz con medio Basfoliar y otro matraz con medio Basfoliar + Urea) y se aforó cada uno a 150 mL añadiendo medio de cultivo a cada matraz, luego de 6 días se añadió 100 mL para completar el volumen del matraz (250 mL).

Se implementó un sistema Fotobiorreactor (FBR), el cual consiste en colocar un difusor de aire para acuarios conectado a mangueras plásticas, con el fin de suministrar oxígeno a los matraces y un tapón hecho con gasa y algodón para evitar contaminación externa, junto con lámparas de luz con el fotoperiodo ya establecido.

Posteriormente, luego de 4 días de crecimiento en los matraces se procedió al escalado en el balón de 12 L. Se juntaron los dos matraces, cada uno con un volumen de 250 mL, obteniendo 500 mL de la microalga, este volumen se colocó en el balón y se le añadió 1 L de Medio Basfoliar + Urea, debido a que se evidenció más crecimiento celular en este Medio de cultivo.

Luego de 9 días de crecimiento en el balón de vidrio de 12 L (Figura 4), se procedió a añadir 1 L más de Medio de cultivo para finalizar el proceso de escalado y realizar los métodos de separación de la biomasa establecidos.



3.7.2. Escalado de *Nostoc* sp.

Relacionando los procesos descritos por Arizmendi, Martínez, Lujan, et al., (2023) para el cultivo de cianobacterias mediante sistemas cerrados tipo biorreactores, generalmente diseñados en forma vertical y a partir de diversos tipos de materiales transparentes, para garantizar la inocuidad y la eficiencia fotosintética.

Una vez obtenida las primeras siembras viables en Medio sólido, aislamos una porción de biomasa y se diluye en tubos de ensayo con 10mL de Medio líquido BG11₀ + Urea y otro con el Medio líquido BG11₀, posteriormente se traslada a un volumen de 250 mL en tubo de ensayo y finalmente a 1 L, una vez obtenido el cultivo a volumen de 1 L se lo puede escalar a volúmenes de 5 L, en condiciones al exterior tanto de forma abierta, como de forma cerrada en contenedores plásticos esterilizados.

3.8. Separación de biomasa

Para la concentración de la biomasa de las especies se utilizaron tres métodos diferentes los cuales son: centrifugación, filtración y decantación, con el objetivo de establecer el mejor método para cada especie.

- **Centrifugación**

Como se puede observar en la Tabla 7, para el método de centrifugación se siguió la metodología propuesta por Mera, (2015) en la cual se instauró cuatro tratamientos diferentes con variaciones en el tiempo y revoluciones por minuto, para establecer el mejor porcentaje de rendimiento para la separación de la biomasa.

Tabla 7. Tratamientos de centrifugación

Tiempo (min)	RPM (Revoluciones por minuto)
2 min	1000
4 min	1800
6 min	2500
8 min	3500

Fuente: (Los autores, 2024).

Para el cálculo del rendimiento de centrifugación se empleó la fórmula descrita en la Ecuación 3.

$$\%R = \frac{(D_{ac}) - (D_{dc})}{(D_{ac})} * 100$$

Ecuación 3. Rendimiento de centrifugación

Donde:

$\%R$ = Rendimiento de separación de biomasa por centrifugación.

D_{ac} = Densidad celular antes de centrifugar.

D_{dc} = Densidad celular después de centrifugar.

También se tomó en cuenta en cada ensayo de centrifugación si las células son dañadas o no, con el objetivo de escoger el mejor tratamiento de separación de biomasa considerando la viabilidad celular, utilizando el microscopio óptico.

- **Filtración**

Para la microalga *Chlorella* sp, se siguió lo propuesto por Cabrera, (2016) que expone que al ser un microorganismo de menor dimensión conviene usar filtros de 1 micra junto con el equipo de filtración con bomba de vacío. Para este método se colocó 250 mL del medio de cultivo junto con la biomasa a separar, se tomó en cuenta el tiempo de filtración y el volumen final obtenido. En el caso de *Nostoc* sp, al ser un microorganismo de mayor tamaño y que posee exopolisacáridos no se empleó el método de filtración.

- **Decantación**

Siguiendo la metodología propuesta por Andrade et al., (2009), se colocó un volumen de 750 mL del medio de cultivo junto con la biomasa a separar, se puso en el embudo de decantación para realizar la separación de la fase líquida (Medio de cultivo) de la fase sólida (biomasa), se tomó en cuenta el volumen final obtenido del proceso y también el tiempo total empleado para la separación con el fin de realizar una comparativa con los otros métodos propuestos.

3.9. Inoculación de semillas de *Zea mays* L. a diferentes tratamientos.

3.9.1 Selección de semillas.

- **Flotación:**

La separación de semillas vanas de las llenas es recomendable como primer paso. Según lo mencionado por Varela & Arana, (2011) este método se lleva a cabo colocando las semillas en un recipiente con agua, luego de 15 minutos las semillas que son viables o llenas se hundirán

en el recipiente, mientras que la porción de las semillas vanas o vacías quedarán flotando en la superficie como se puede observar en la Figura 4.



3.9.2. Protocolo de desinfección de semillas

A las semillas seleccionadas luego del proceso antes mencionado, se les aplicó un protocolo de desinfección para evitar contaminación de cualquier índole. Se siguió el protocolo propuesto por Varela & Arana, (2011) aplicando los siguientes pasos: lavar las semillas durante 1 minuto con agua jabonosa, se sumergió las semillas en hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto, luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril para remover el hipoclorito de sodio, posteriormente se sumergió las semillas en etanol al 70% durante 1 minuto y finalmente las semillas se sometieron a un abundante lavado con agua destilada estéril para retirar cualquier residuo.

3.9.3. Pretratamiento en biomasa de *Nostoc* sp.

Se inició con un protocolo de desinfección aplicado directamente a la biomasa que constó de 3 fases, en las que se sumergió la biomasa en agua con jabón las 10 %, posteriormente se sumergió en agua destilada para retirar el exceso de jabón, se pasó la biomasa a sumergir en alcohol al 70 % y agua destilada para retirar el alcohol, finalmente la biomasa limpia pasó a

pretratamiento donde se planteó enriquecer la biomasa sumergiéndola en Medio BG11₀ sin fuente de nitrógeno durante 24 h.

3.9.4. Tratamientos aplicados a semillas de maíz

Una vez obtenida la biomasa concentrada y escalada a volúmenes de 1 L , se indujo a los diferentes tratamientos establecidos en la Tabla 8, para lo cual se implementó semilleros de 7 pocillos, junto a una mezcla de sustratos sólidos: Tierra negra (40 %), Turba (40 %), Perlita (20 %) los cuales fueron esterilizados previo a su utilización, se inocularon las semillas para evidenciar el índice de crecimiento de las mismas en las diferentes concentraciones de biomasa enriquecida perteneciente a cada especie y tratamiento.

Tabla 8. Tratamientos para medir índice de germinación.

Tratamientos	Descripción	# Semillas inoculadas	Medio de cultivo	Identificador
1	<i>Chlorella</i> en alta concentración	6	Sustrato	(T 1)
2	<i>Chlorella</i> en baja concentración	6	Sustrato	(T 2)
3	<i>Nostoc</i> en alta concentración	6	Sustrato	(T 3)
4	<i>Nostoc</i> en baja concentración	6	Sustrato	(T 4)
5	<i>Nostoc</i> (+) y <i>Chlorella</i> (-)	6	Sustrato	(T 5)
6	<i>Nostoc</i> (-) y <i>Chlorella</i> (+)	6	Sustrato	(T 6)
7	Fertilizante 10:30:10	6	Sustrato	(T 7)

Fuente: (Los autores, 2024).

3.10. Variables de evaluación.

Dentro del análisis inicial de valores a relacionar se encuentra la cinética de crecimiento de *Chlorella* sp y *Nostoc* sp, la cual se realizó diariamente mediante conteo celular con la ayuda de la cámara de Neubauer y Sedgewick-Rafter respectivamente.

Posterior al análisis de cinética de crecimiento se procedió con la evaluación del efecto biofertilizante correspondiente a las diferentes formulaciones de los tratamientos

implementados, en función a ello se presenta un análisis del índice de germinación el cual se obtuvo aplicando la Ecuación 4, para determinar mediante un análisis de varianza la diferencia significativa del efecto biofertilizante de los diferentes tratamientos modelo evaluados.

$$\%Germinación = \frac{\# \text{ de semillas germinadas}}{\text{Total de semillas en un lote}} \times 100$$

Ecuación 4 % Germinación de semillas

Se analizaron los resultados obtenidos de la germinación en base al número de días, para el análisis estadístico se empleó el Software MiniTab Statistical en el cual se realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia del 95%, donde se plantean las siguientes hipótesis a probar:

Ho: ($p > 0,05$) No existe una asociación significativa entre la aplicación de biofertilizantes a base de microalgas, en relación con la germinación de las semillas.

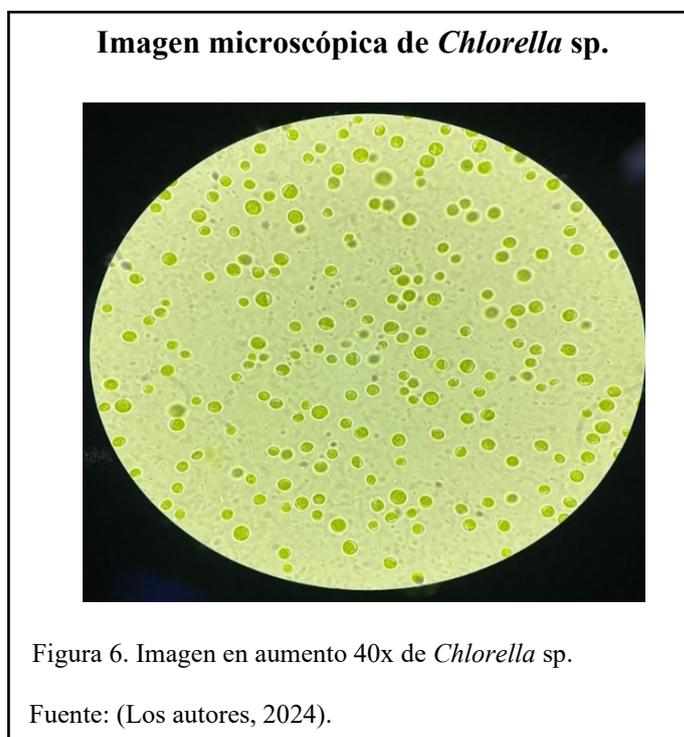
H1: ($p < 0,05$) Existe una asociación significativa entre la aplicación de biofertilizantes a base de microalgas, en relación con la germinación de semillas.

Finalmente se evaluó el desarrollo de las plántulas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos establecidos, analizando características como: longitud de las hojas, número de hojas, longitud de la raíz principal, número de raíces y altura de las plántulas.

4. Resultados y discusión

4.1. Identificación de *Chlorella* sp.

Una vez obtenido los primeros cultivos de la microalga en Medio sólido, se tomó una muestra inicial de una caja con un asa de estriado y se la colocó en portaobjetos para poder visualizar y constatar la presencia de *Chlorella* sp. Según lo descrito por el autor Coronado-Reyes et al. (2022), se logró identificar las características morfológicas distintivas de *Chlorella* sp., tal como su forma esférica o elipsoidal y la presencia de uno o varios cloroplastos verdosos en el citoplasma celular, tal como se puede observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** validando así la identidad de la especie presente en el cultivo experimental.



4.2. Identificación de *Nostoc* sp.

Una vez obtenida la muestra de la biomasa en estado natural, para poder observar las estructuras diferenciales del *Nostoc* sp, se molió con mortero una porción de la biomasa con agua destilada y posteriormente se observa en microscopio óptico obteniendo así una imagen clara de las estructuras filamentosas pertenecientes a *Nostoc* sp como lo muestra la Figura 7.

Imagen microscópica de *Nostoc* sp.

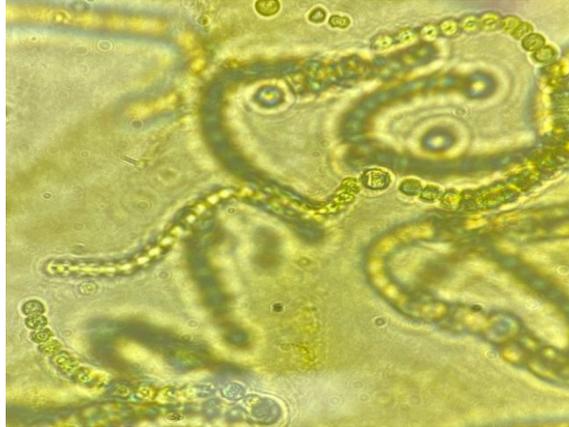


Figura 7. Vista de *Nostoc* sp en aumento 40x

Fuente: (Los autores, 2024).

Relacionando lo descrito por Ortiz-Moreno et al., (2020) cabe resaltar que en la visualización en microscopio de la microalga no solamente se encontró los filamentos correspondientes a *Nostoc* sp, también se identificó otras cianobacterias que conforman el consorcio de la microalga como es el caso de *Anabaena* sp y *Chlamydomonas* sp.

4.3. Aislamiento de las muestras de *Chlorella* sp.

Una vez identificadas las dos microalgas para el estudio, se procedió a efectuar su aislamiento en cajas Petri con el fin de observar de manera óptica su crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. Como se muestra en la Figura 8, se comparó el crecimiento de *Chlorella* sp. en Medios con y sin urea, destacando una mayor concentración de biomasa en el Medio con urea. Después de confirmar esta característica, se procedió a medir el crecimiento de la microalga en Medio líquido durante un período de 10 días utilizando la cámara de Neubauer y realizando mediciones constantes de cada día transcurrido, obteniendo así la información necesaria que permitió reconocer y evaluar la diferencia en la cinética de crecimiento, diferenciando la concentración de biomasa según el Medio empleado.

Diferencia de crecimiento de *Chlorella sp* según la fuente de Nitrogeno



Figura 8. Crecimiento de *Chlorella sp* en medio Basfoliar sólido y Basfoliar + Urea

Fuente: (Los autores, 2024).

Nota: Caja Petri de la izquierda corresponde al crecimiento en medio Basfoliar mientras que la caja Petri de la derecha corresponde al medio Basfoliar + Urea.

4.4. Aislamiento de las muestras de *Nostoc sp*.

En el caso de *Nostoc sp*, se molió la biomasa con un mortero para homogenizar la microalga y con la ayuda de una aza de estriado se sembró en cajas Petri con 2 diferentes medios de cultivo prediseñados.

Debido que el consorcio de Cianobacterias que conforman el *Nostoc* contiene una alta cantidad de diferentes especies de cianobacterias, desde la siembra inicial, se identificó y se aisló una caja Petri donde se observó un crecimiento variado de cianobacterias como se muestra en la Figura 9, así mismo el aislamiento de la cepa pura de *Nostoc sp* fue complicada y tardía, por ende fue de gran ayuda la identificación paulatina de cada tipo de cianobacteria que apareció. Por otra parte, solo las cajas Petri sembradas con el medio BG11₀, presentaron crecimiento en comparación con las sembradas en BG11₀+Urea, por ende, este medio sin fuente de nitrógeno resultó ser más propicio.

Caja Petri de crecimiento *In Vitro*



Figura 9. Placa con crecimiento variado de cianobacterias provenientes de la biomasa de *Nostoc* sp.

Fuente: (Los autores 2024)

Nota: Las colonias del círculo rojo fueron de intereses para posteriormente aislarlas.

Las aglutinaciones observadas conformaron los primeros indicios del crecimiento de la biomasa purificada de *Nostoc* sp, la cual fue separada del medio inicial donde creció para evidenciar que efectivamente se trata de la cepa de *Nostoc* sp y aislarla de las demás cianobacterias presentes en la caja Petri. Como se puede evidenciar en Figura 10, mediante la observación en microscopio óptico, se logró la identificación de esta cianobacteria de forma precisa mediante la vista en aumento de 40x y 100x, cabe resaltar que una de las problemáticas más grandes que presento en el aislamiento de esta cepa fue la cantidad de tiempo que demoro en crecer la biomasa en el medio BG11₀ que fue de 25 a 40 días.

Aislamiento de *Nostoc* sp

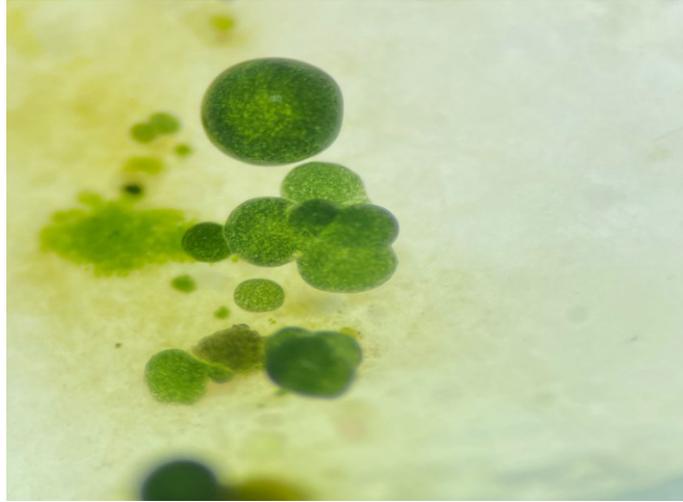


Figura 10. Biomasa de *Nostoc* sp en crecimiento en caja Petri

Fuente: (Los autores, 2024).

Nota: Colonias identificadas por su forma esférica, coloración verdosa compuestas en filamentos llamados tricomas.

4.5. Cinética de crecimiento de *Chlorella* sp.

Una vez obtenida la biomasa concentrada en cajas Petri se transfirió con la ayuda de una aza metálica una pequeña cantidad de la biomasa concentrada a 5 tubos de ensayo con 10 mL de medio líquido tanto Basfoliar como Basfoliar con fuente de nitrógeno, de esta forma se obtuvo una concentración inicial de biomasa en medio líquido y posteriormente se realizó una cosecha de los tubos con un volumen total de 150 mL.

Al cabo de 5 días la biomasa pudo verse concentrada en los tubos gracias a su sedimentación y coloración, en este estadio se procedió a transferir los 150 mL de volumen inicial a un volumen mayor de 200 mL en Matrices Erlenmeyer para los 2 medios de cultivo, midiendo la cinética de crecimiento inicial con la ayuda de la cámara de Neubauer, la cinéticas de crecimiento se evaluó en un lapso inicial de 7 días previo al escalado a volumen de 250 mL como se evidencia en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Cinética de crecimiento en volumen inicial de (150mL)

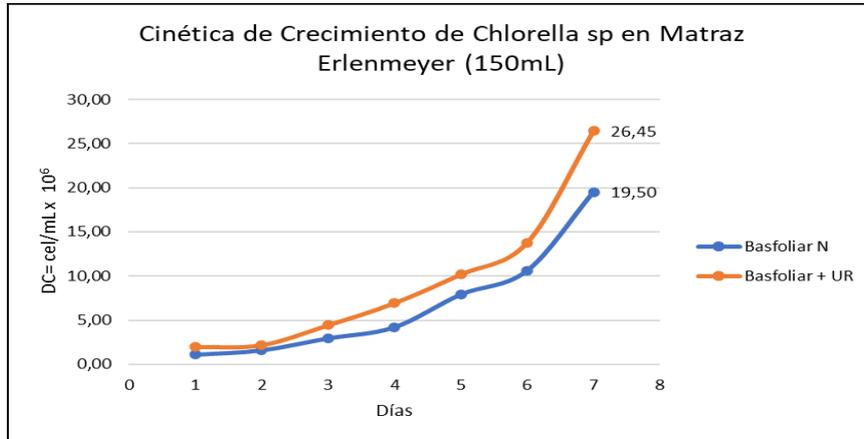


Figura 11. Cinética de crecimiento en volumen inicial de (150mL).

Fuente: (Los autores, 2024)

Una vez obtenidos los valores iniciales y alcanzada la saturación celular en los 150 mL correspondientes a la fase estacionaria del cultivo, se añadieron 100 mL adicionales de cada medio en sus respectivos matraces. Como se muestra en la Figura 12, se observó nuevamente una cinética de crecimiento exponencial de *Chlorella sp.* después de 4 días, este paso nos permitió escalar el cultivo al volumen deseado de 1 L.

Cinética de crecimiento en volumen de 250mL

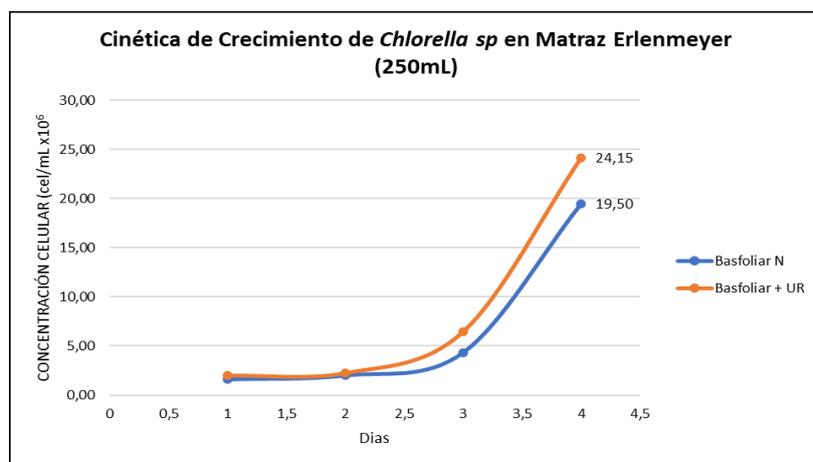
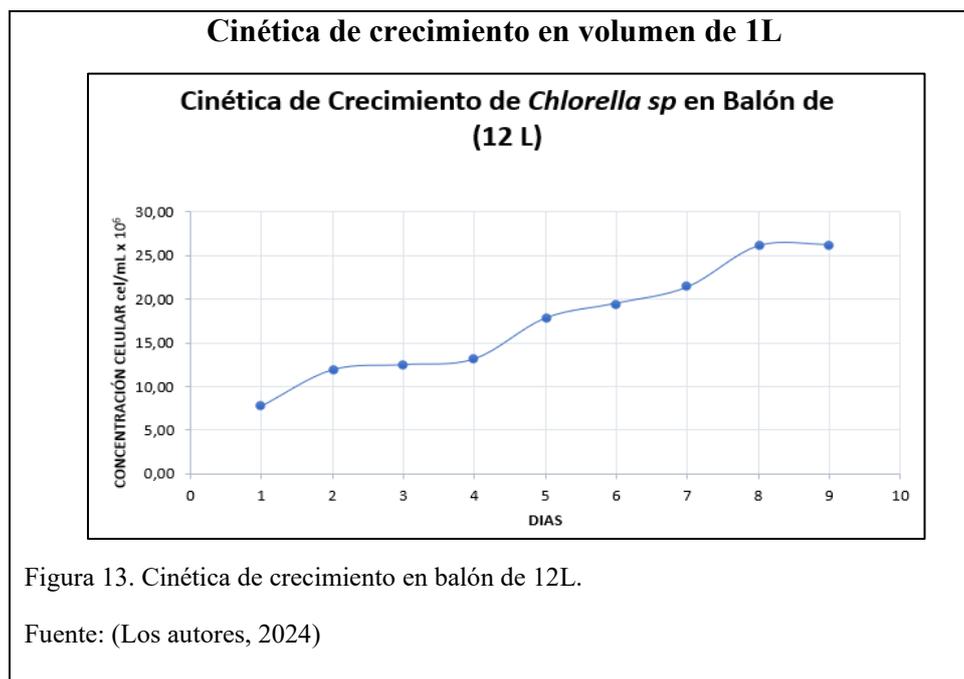


Figura 12. Cinética de crecimiento en volumen de (250mL)

Fuente: (Los autores, 2024)

Posteriormente, tras observar las diferencias en la densidad celular según la fuente de nitrógeno, se combinaron los dos matraces Erlenmeyer de 250 mL para obtener un volumen total de 500 mL, los cuales se aforaron con 1 L de medio de cultivo con fuente de nitrógeno dentro de un balón de 12 L. Se evaluó la cinética de crecimiento final durante un período de 9 días, como se muestra en la Figura 13, antes de separar la biomasa para concentrar las células que formarían la formulación de los

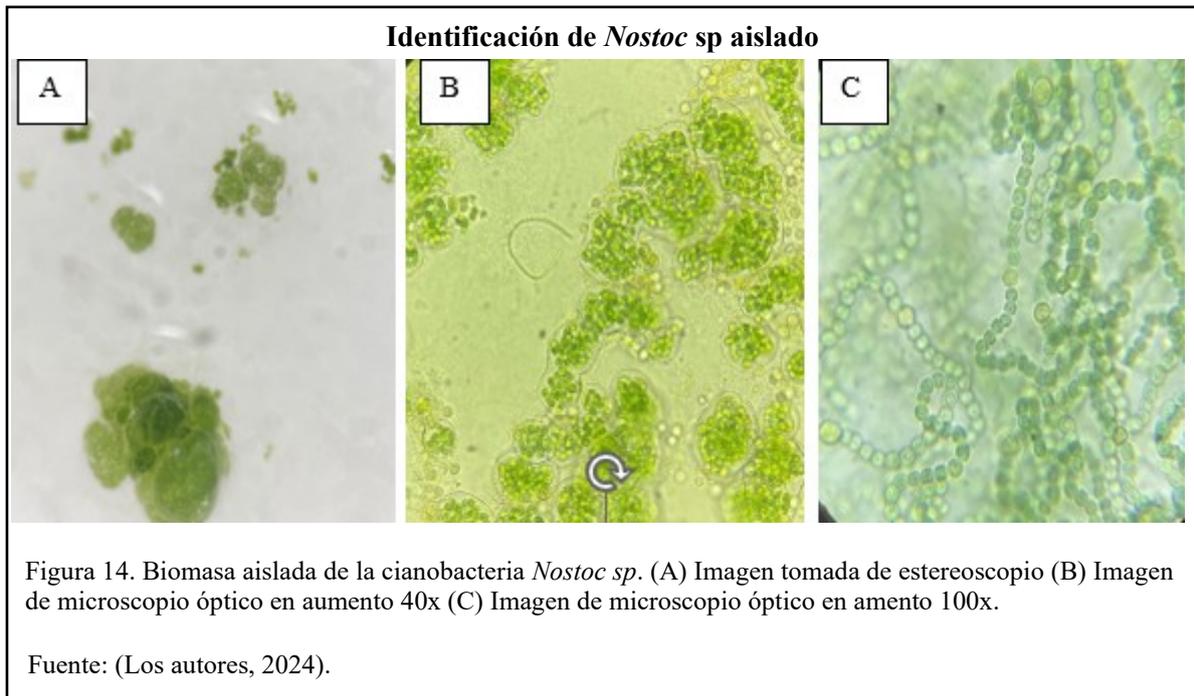


Según el estudio realizado por Abril, (2022) en el cual se usó Medio Basfoliar para la especie de microalga *Scenedesmus sp*, se evidenció un desarrollo satisfactorio de la especie, obteniendo un crecimiento exponencial a partir de los 9 días, lo cual se puede contrastar con la cinética de crecimiento de *Chlorella sp* obtenida en el presente trabajo, respaldando que es un Medio de cultivo efectivo para microalgas y de bajo costo.

4.6. Crecimiento de *Nostoc sp*.

Una vez aislada la cepa, se inoculó la biomasa en tubos de ensayo con 10 mL de medio BG11₀ y BG11₀ con fuente de nitrógeno. Tras un período de 20 días, no se observó un

crecimiento notable de la biomasa en ninguno de los dos medios líquidos, razón por la cual se concluyó que la única opción viable para cultivar la cianobacteria era utilizar cajas Petri. Esto se corroboró al trasplantar la biomasa a nuevas cajas Petri con medio de cultivo BG11₀, como se puede ver en la Figura 14. En este contexto, fue posible observar en el microscopio la forma de reproducción de la cianobacteria mediante la visualización de estructuras conocidas como hormogonias, las cuales son características de la reproducción asexual de estas cianobacterias.



4.7. Métodos de separación.

4.7.1. Centrifugación

Luego de realizar los tratamientos establecidos para este método de separación, se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla 9 que corresponden al porcentaje de rendimiento de separación de la biomasa lo cual permitió reconocer la mejor concentración del pellet que constituye la concentración de biomasa separada del medio líquido.

Tabla 9. Rendimiento de separación de biomasa mediante centrifugación

Tiempo(min)	RPM (Revoluciones por minuto)	% Rendimiento de separación de biomasa
2	1000	83.30 %
4	1800	93.33 %
6	2500	96.12 %
8	3500	97.31 %

Fuente: (Los autores 2024)

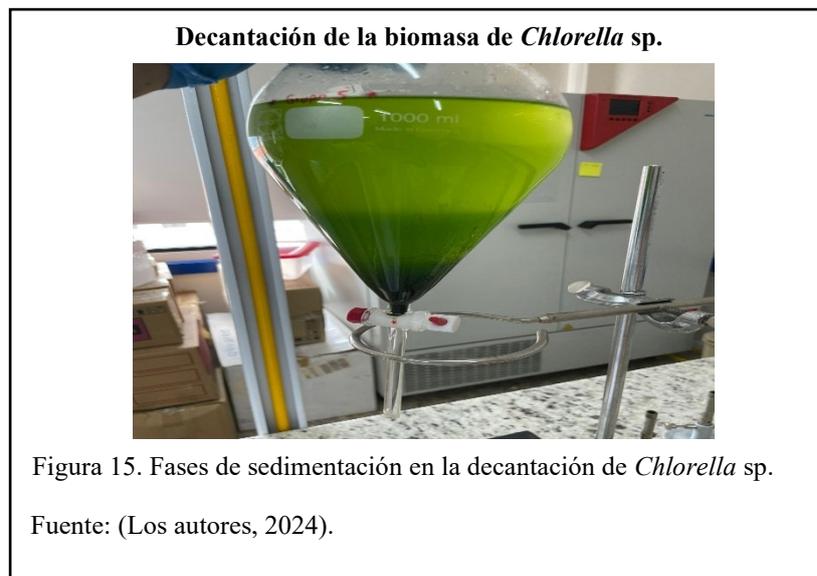
Analizando los resultados obtenidos por centrifugación, se puede evidenciar que el tratamiento con mayor porcentaje de rendimiento de separación fue el T4 (8 min * 3500 RPM), logrando un 97% de efectividad, además de que al ser visto al microscopio no se encontró daño celular.

Estos resultados se pueden contrastar con lo expuesto por Mera (2015), en los cuales se evidenció que a partir de velocidades angulares de 1000 RPM ya se puede recuperar biomasa microalgal en un porcentaje relativamente bajo, pero este porcentaje de separación se optimiza aumentando la velocidad angular y el tiempo, obteniendo valores de 97% y 98% de rendimiento a partir de 3500 RPM.

Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Soto et al. (2020), se utilizó una centrifugación a 3000 RPM durante 15 min para separar biomasa de *Chlorella vulgaris*, indicando que esta velocidad es adecuada para la separación de la especie *Chlorella*. Además, en el trabajo realizado por Herrera, (2020), se aplicó 3500 RPM para obtener biomasa de *Chlorella* sp lo cual permitió obtener un porcentaje elevado de separación.

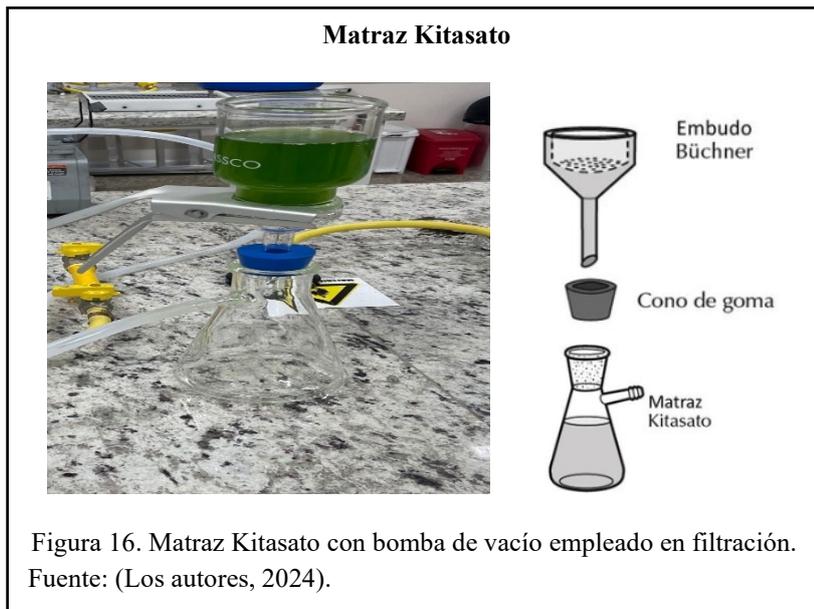
4.7.2. Decantación.

Este método no se postuló como uno eficaz al momento de separar biomasa, debido a que no se utiliza alguna sustancia que facilite la precipitación de la biomasa, los 750 mL empleados de medio tardaron en sedimentar y separarse la biomasa correspondiente, un total de 126 h, se puede observar en la Figura 15 las diferentes fases que forma la separación de biomasa en esta técnica.



4.7.3. Filtración

Implementando el matraz Kitasato junto con una bomba de vacío específico para capturar células en un filtro de microporos como se puede apreciar en la Figura 16, según el objetivo propuesto este puede utilizarse de 2 formas, la primera en la cual se busca concentrar la biomasa en un filtro de microporos y la segunda para separar el medio líquido de la biomasa.



4.7.2. Cuadro comparativo de técnicas implementadas en la separación de biomasa.

Como se puede observar en la Tabla 10 se hizo una comparación de los tres métodos de separación empleados en función a: tiempo total empleado, volumen inicial empleado y el volumen recuperado de biomasa concentrada.

Se pudo evidenciar que la mejor técnica de separación de biomasa corresponde a la centrifugación, en la cual se observa que se emplea un tiempo total mucho menor a comparación de la filtración y decantación, recuperando más volumen de biomasa concentrada y sin producir daño celular alguno para su posterior uso como biofertilizante. En el estudio realizado por Molina Grima et al., (2003) se concluye que este método representa una de las técnicas con mayor eficiencia y mejores rendimientos de separación de biomasa del cultivo de microalgas. Según los autores se pueden alcanzar eficiencias del 95%, pero la técnica no es recomendable cuando se trata de grandes volúmenes de cultivo, debido a que el tiempo empleado encarecería de manera considerable el proceso.

En otro estudio de Pérez Rial (2019), se señala que la centrifugación es una técnica fiable, rápida y válida para la mayoría de las microalgas estudiadas pero que la eficiencia del método es condicionada por las características de cada especie, la velocidad de centrifugación

y el tiempo. En el mismo estudio se señala que la filtración que funciona bajo presión o mediante vacío es un proceso satisfactorio para recuperar microalgas relativamente grandes, pero que no logran recuperar organismos que se aproximan a dimensiones bacterianas como lo es *Chlorella*.

Tabla 10. Comparación de métodos de separación de biomasa

Método de separación	Tiempo total empleado	Volumen Implementado del escalado	Volumen recuperado de biomasa concentrada
Centrifugación	0.5 horas	750mL	85 mL
Filtración	15 horas	750 mL	10 mL
Decantación	126 horas	750 mL	50 mL

Fuente: (Los Autores 2024)

4.8. Inoculación de semillas con diferentes tratamientos.

La descripción de los tratamientos empleados en esta investigación junto con la composición de los sustratos y su respectiva proporción del bioestimulantes creado se encuentra detallados a continuación en la Tabla 11, donde se enumera un total de siete tratamientos y se evalúan en un total de seis semillas por tratamiento.

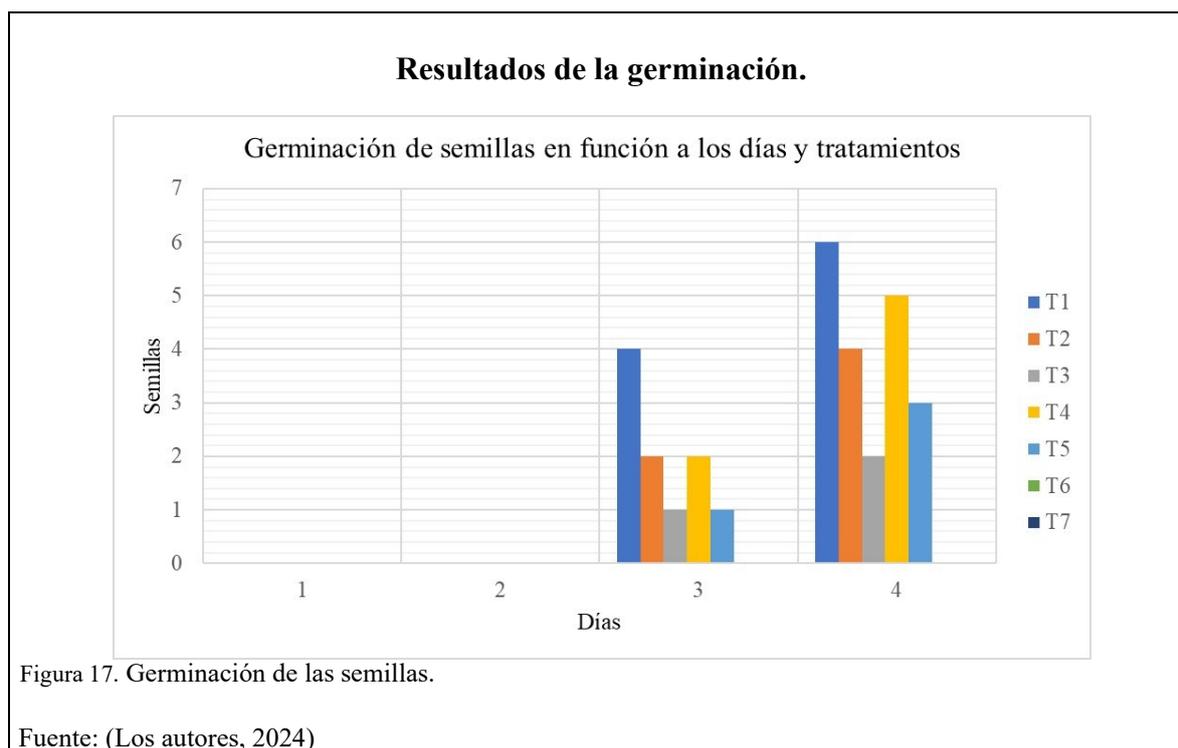
Tabla 11. Descripción de Tratamientos.

Tratamiento	Sustrato	Microalga	Proporción del Bioestimulante	# Semillas
T1	Tierra 50g	<i>Chlorella</i>	5mL	6
T2	Tierra 50g	<i>Chlorella</i>	2,5mL	6
T3	Tierra(50g) + Biomasa	<i>Nostoc</i>	2,5g	6
T4	Tierra(50g) + Biomasa	<i>Nostoc</i>	1,5g	6
T5	Tierra 50g	N+C	2,5g/2,5mL	6
T6	Tierra 50g	C+N	5mL/1,5g	6
T7	Tierra 50g	10:30:10	5mL	6

Fuente: (Los autores 2024).

4.9. Índice de Germinación

En el presente diagrama de columnas agrupadas Figura 17 se puede presenciar los resultados obtenidos del número de semillas germinadas según los tratamientos evaluados en un lapso de 4 días, mostrando un índice de germinación únicamente en los tratamientos (1,2,3,4 y 5).



4.10. Análisis de Varianza y pruebas de Tukey.

4.10.1. Análisis estadístico de la germinación de semillas

Se evaluaron los 7 tratamientos mencionados en la Tabla 11 correspondientes a los biofertilizantes a base de microalgas y control químico; se rotularon como T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7 con un total de 6 repeticiones por tratamiento evaluados en un periodo de 11 días. Una vez realizado el análisis de varianza con una confianza del 95% se obtuvo un valor p de 0,000 Figura 18, por lo cual según definiciones teóricas de (Minitab 2019) al ser ($p > 0,05$), rechaza

la hipótesis nula, es decir, existe una asociación significativa entre la aplicación de biofertilizantes a base de microalgas, en relación con la germinación de las semillas.

Análisis de Varianza de un factor para la germinación de semillas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	5,476	0,9127	6,39	0,000
Error	35	5,000	0,1429		
Total	41	10,476			

Figura 18 ANOVA de la germinación de semillas

Fuente: (Los autores, 2024)

Nota: Resultado de ANOVA de un factor de MiniTab (2019).

Por otro lado, después de obtener los resultados de ANOVA, se procedió a realizar la prueba de Tukey y según los resultados obtenidos en el Software Minitab19 correspondientes a la Figura 19, se muestra que las agrupaciones con letras diferentes son significativamente diferentes con un nivel de significancia al 95%, en este caso nos permitió decidir que la agrupación A (T1 y T4) son los tratamientos más efectivos para la aplicación de biofertilizantes en función a la germinación de semillas de maíz.

Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%

Factor	N	Media	Agrupación
T1	6	1,000	A
T4	6	0,833	A
T2	6	0,667	A B
T5	6	0,500	A B
T3	6	0,333	B
T7	6	0,000000	B
T6	6	0,000000	B

Figura 19. Prueba de Tukey en germinación de semillas

Fuente: (Los autores, 2024)

Nota: Las agrupaciones con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

4.10.2. Análisis estadístico del crecimiento de las plántulas.

En función al crecimiento de la plántula en (cm) al onceavo día después de su siembra. Se realizó el análisis de varianza ANOVA con una confianza del 95% y se obtuvo un valor p de 0,000 Figura 20, al ser ($p < 0,05$), se acepta la hipótesis alternativa, es decir, existe una asociación significativa entre la aplicación de biofertilizantes a base de microalgas, en relación con el desarrollo de la plántula.

Análisis de Varianza de un factor para la altura de las plántulas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	255,9	42,647	5,88	0,000
Error	35	254,0	7,257		
Total	41	509,9			

Figura 20. Análisis de Varianza de un factor para el desarrollo de la plántula

Fuente: (Los autores, 2024)

Nota: Resultado de ANOVA de un factor de MiniTab (2019).

De igual forma, los resultados obtenidos de la prueba de Tukey representados en la Figura 21, encontramos que las agrupaciones con letras diferentes son significativamente diferentes con un nivel de significancia al 95%, en este caso nos permitió decidir que la agrupación A (T5 y T6) son los tratamientos más efectivos para la aplicación de biofertilizantes en función al crecimiento de la altura de plántulas de maíz medido en (cm).

Prueba Tukey con un nivel de significancia del 95%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
T2 - T1	2,95	1,56	(- 7,81; 1,91)	-1,90	0,496
T3 - T1	2,17	1,56	(- 2,69; 7,03)	1,39	0,802
T4 - T1	1,63	1,56	(- 3,23; 6,49)	1,05	0,938
T5 - T1	3,95	1,56	(- 0,91; 8,81)	2,54	0,177
T6 - T1	2,87	1,56	(- 1,99; 7,73)	1,84	0,529
T7 - T1	2,55	1,56	(- 7,41; 2,31)	-1,64	0,659
T3 - T2	5,12	1,56	(0,28; 9,98)	3,29	0,034
T4 - T2	4,58	1,56	(- 0,28; 9,44)	2,95	0,075
T5 - T2	6,90	1,56	(2,04; 11,76)	4,44	0,002
T6 - T2	5,82	1,56	(0,96; 10,68)	3,74	0,011
T7 - T2	0,40	1,56	(- 4,46; 5,26)	0,26	1,000
T4 - T3	-0,53	1,56	(- 5,39; 4,33)	-0,34	1,000
T5 - T3	1,78	1,56	(- 3,08; 6,64)	1,15	0,909
T6 - T3	0,70	1,56	(- 4,16; 5,56)	0,45	0,999
T7 - T3	-4,72	1,56	(- 9,58; 0,14)	-3,03	0,062
T5 - T4	2,32	1,56	(- 2,54; 7,18)	1,49	0,749
T6 - T4	1,23	1,56	(- 3,63; 6,09)	0,79	0,984
T7 - T4	-4,18	1,56	(- 9,04; 0,68)	-2,69	0,131
T6 - T5	-1,08	1,56	(- 5,94; 3,78)	-0,70	0,992
T7 - T5	-6,50	1,56	(- 11,36; -1,64)	-4,18	0,003
T7 - T6	-5,42	1,56	(- 10,28; -0,56)	-3,48	0,021

Figura 21 Prueba Tukey en altura de plántulas

Fuente: (Los autores, 2024)

4.10.3. Análisis estadístico del crecimiento de número de hojas.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, obteniendo un valor p de 0,002 como se muestra en la Figura 22. Dado que ($p < 0,05$), se acepta la hipótesis alternativa, lo que indica que hay una diferencia significativa entre el uso de biofertilizantes a base de microalgas y el desarrollo de la plántula.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	16,57	2,7619	4,43	0,002
Error	35	21,83	0,6238		
Total	41	38,40			

Figura 22. ANOVA de # Hojas
Fuente: (Los autores, 2024)

Asimismo, los resultados de la prueba de Tukey, presentados en la Figura 23, muestran que las agrupaciones con letras distintas presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Esto nos permitió concluir que T2, T5 y T6 son los tratamientos más efectivos para la aplicación de biofertilizantes, con relación al crecimiento de plántulas de maíz en relación a su número de hojas.

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
T2 - T1	-1,167	0,456	(- 2,592; 0,259)	-2,56	0,170
T3 - T1	0,000	0,456	(- 1,425; 1,425)	0,00	1,000
T4 - T1	0,000	0,456	(- 1,425; 1,425)	0,00	1,000
T5 - T1	0,333	0,456	(- 1,092; 1,759)	0,73	0,990
T6 - T1	0,500	0,456	(- 0,925; 1,925)	1,10	0,925
T7 - T1	-1,167	0,456	(- 2,592; 0,259)	-2,56	0,170
T3 - T2	1,167	0,456	(0,259; 2,592)	2,56	0,170
T4 - T2	1,167	0,456	(0,259; 2,592)	2,56	0,170
T5 - T2	1,500	0,456	(0,075; 2,925)	3,29	0,034
T6 - T2	1,667	0,456	(0,241; 3,092)	3,65	0,013
T7 - T2	0,000	0,456	(- 1,425; 1,425)	0,00	1,000
T4 - T3	0,000	0,456	(- 1,425; 1,425)	0,00	1,000
T5 - T3	0,333	0,456	(- 1,092; 1,759)	0,73	0,990
T6 - T3	0,500	0,456	(- 0,925; 1,925)	1,10	0,925
T7 - T3	-1,167	0,456	(- 2,592; 0,259)	-2,56	0,170
T5 - T4	0,333	0,456	(- 1,092; 1,759)	0,73	0,990
T6 - T4	0,500	0,456	(- 0,925; 1,925)	1,10	0,925
T7 - T4	-1,167	0,456	(- 2,592; 0,259)	-2,56	0,170
T6 - T5	0,167	0,456	(- 1,259; 1,592)	0,37	1,000
T7 - T5	-1,500	0,456	(- 2,925; -0,075)	-3,29	0,034
T7 - T6	-1,667	0,456	(- 3,092; -0,241)	-3,65	0,013

Figura 23. Prueba Tukey en # de Hojas
Fuente: (Los Autores, 2024)

4.10.4. Análisis estadístico del tamaño de hojas.

Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, para analizar el crecimiento de la planta en función al tamaño de las hojas, se obtuvo un resultado del valor p de (0,000) como se muestra en la Figura 24. Dado que ($p < 0,05$), se confirma la hipótesis alternativa, indicando que el uso de biofertilizantes a base de microalgas tiene un impacto significativo en el desarrollo de las plántulas en base al tamaño de las hojas.

Análisis de Varianza de un factor para el tamaño de Hojas.					
<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC Ajust.</u>	<u>MC Ajust.</u>	<u>Valor F</u>	<u>Valor p</u>
Factor	6	138,6	23,094	6,10	0,000
Error	35	132,5	3,786		
Total	41	271,1			

Figura 24. ANOVA de tamaño de hojas
Fuente: (Los autores, 2024)

Del mismo modo, los resultados obtenidos de la prueba de Tukey en cuanto al tamaño de las hojas en plántulas de maíz Figura 25, muestran que las agrupaciones marcadas presentan diferencias estadísticamente significativas. Este análisis nos permitió determinar (T2, T4, T5 y T6), son los más eficaces para la aplicación de biofertilizantes. En particular, estos tratamientos se destacaron en términos del crecimiento de plántulas de maíz, evaluado el tamaño de hojas producidas y evidenciando su superioridad en comparación con los otros tratamientos analizados

Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
T 2 - T 1	-3,22	1,12	(-6,73; 0,29)	-2,86	0,091
T 3 - T 1	0,10	1,12	(-3,41; 3,61)	0,09	1,000
T 4 - T 1	0,82	1,12	(-2,69; 4,33)	0,73	0,990
T 5 - T 1	2,00	1,12	(-1,51; 5,51)	1,78	0,569
T 6 - T 1	1,47	1,12	(-2,04; 4,98)	1,31	0,845
T 7 - T 1	-2,48	1,12	(-5,99; 1,03)	-2,21	0,316
T 3 - T 2	3,32	1,12	(-0,19; 6,83)	2,95	0,075
T 4 - T 2	4,03	1,12	(0,52; 7,54)	3,59	0,016
T 5 - T 2	5,22	1,12	(1,71; 8,73)	4,64	0,001
T 6 - T 2	4,68	1,12	(1,12; 8,19)	4,17	0,003
T 7 - T 2	0,73	1,12	(-2,78; 4,24)	0,65	0,994
T 4 - T 3	0,72	1,12	(-2,79; 4,23)	0,64	0,995
T 5 - T 3	1,90	1,12	(-1,61; 5,41)	1,69	0,626
T 6 - T 3	1,37	1,12	(-2,14; 4,88)	1,22	0,883
T 7 - T 3	-2,58	1,12	(-6,09; 0,93)	-2,30	0,273
T 5 - T 4	1,18	1,12	(-2,33; 4,67)	1,05	0,937
T 6 - T 4	0,65	1,12	(-2,86; 4,16)	0,58	0,997
T 7 - T 4	-3,30	1,12	(-6,81; 0,21)	-2,94	0,077
T 6 - T 5	-0,53	1,12	(-4,04; 2,98)	-0,47	0,999
T 7 - T 5	-4,48	1,12	(-7,99; -0,97)	-3,99	0,005
T 7 - T 6	-3,95	1,12	(-7,46; -0,44)	-3,52	0,019

Figura 25. Prueba de Tukey para el tamaño de hojas.

Fuente: (Los autores, 2024)

4.10.5. Análisis estadístico del número de raíces.

De igual forma, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% para evaluar el crecimiento de las plantas en función al número de raíces. El valor p obtenido fue de 0,835 como se indica la Figura 26. Dado que ($p > 0,05$), se acepta la hipótesis nula, lo que sugiere que la aplicación de biofertilizantes a base de microalgas no tiene un efecto significativo en el desarrollo de las plántulas de maíz en función al número de raíces.

Análisis de Varianza de un factor para el numero de Raíces.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	6,143	1,024	0,46	0,835
Error	35	78,333	2,238		
Total	41	84,476			

Figura 26. ANOVA del número de raíces

Fuente: (Los autores, 2024)

Los resultados de la prueba de Tukey, presentados en la Figura 27, indican que no se observan agrupaciones diferentes en cuanto al número de raíces de las plántulas. Esto se debe a que las medias de los grupos comparados no muestran diferencias significativas, en otras palabras, las variaciones en el número de raíces entre los diferentes tratamientos no son estadísticamente distintas, lo que sugiere que los distintos tratamientos no tienen un impacto diferencial en el desarrollo de las raíces de las plántulas.

Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%						
Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado	
T2 - T1	-1,000	0,864	(-3,700; 1,700)	-1,16	0,905	
T3 - T1	0,000	0,864	(-2,700; 2,700)	0,00	1,000	
T4 - T1	0,000	0,864	(-2,700; 2,700)	0,00	1,000	
T5 - T1	-0,167	0,864	(-2,866; 2,533)	-0,19	1,000	
T6 - T1	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T7 - T1	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T3 - T2	1,000	0,864	(-1,700; 3,700)	1,16	0,905	
T4 - T2	1,000	0,864	(-1,700; 3,700)	1,16	0,905	
T5 - T2	0,833	0,864	(-1,866; 3,533)	0,96	0,958	
T6 - T2	0,333	0,864	(-2,366; 3,033)	0,39	1,000	
T7 - T2	0,333	0,864	(-2,366; 3,033)	0,39	1,000	
T4 - T3	0,000	0,864	(-2,700; 2,700)	0,00	1,000	
T5 - T3	-0,167	0,864	(-2,866; 2,533)	-0,19	1,000	
T6 - T3	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T7 - T3	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T5 - T4	-0,167	0,864	(-2,866; 2,533)	-0,19	1,000	
T6 - T4	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T7 - T4	-0,667	0,864	(-3,366; 2,033)	-0,77	0,986	
T6 - T5	-0,500	0,864	(-3,200; 2,200)	-0,58	0,997	
T7 - T5	-0,500	0,864	(-3,200; 2,200)	-0,58	0,997	
T7 - T6	0,000	0,864	(-2,700; 2,700)	0,00	1,000	

Figura 27. Prueba de Tukey en número de Raíces

Fuente: (Los autores, 2024)

4.10.6. Análisis estadístico del tamaño de la raíz principal.

Finalmente, los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el tamaño de la raíz principal Figura 28, revelan un valor p de 0,002. Dado que este valor es menor que el umbral de 0,05 se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, esto muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al tamaño de la raíz principal de las

plántulas. En otras palabras, los distintos tratamientos en la aplicación de biofertilizantes tienen un impacto en el desarrollo de la raíz principal.

Análisis de Varianza de un factor para el Tamaño de la Raíz principal.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	830,2	138,37	4,27	0,002
Error	35	1133,0	32,37		
Total	41	1963,3			

Figura 28. ANOVA del Tamaño de la Raíz

Fuente: (Los autores, 2024)

Para en análisis de la prueba de Tukey mostrado en la Figura 29 con significancia del 95%, las agrupaciones con letras distintas indicaron que las medias de los tratamientos varían significativamente entre sí. Esto sugiere que los tratamientos T2, T3, T5 y T6 tienen un impacto notable en el tamaño de la raíz principal y, en consecuencia, estos resultados de Tukey nos permitieron identificar a estos tratamientos como los más efectivos en cuanto al crecimiento de la raíz principal.

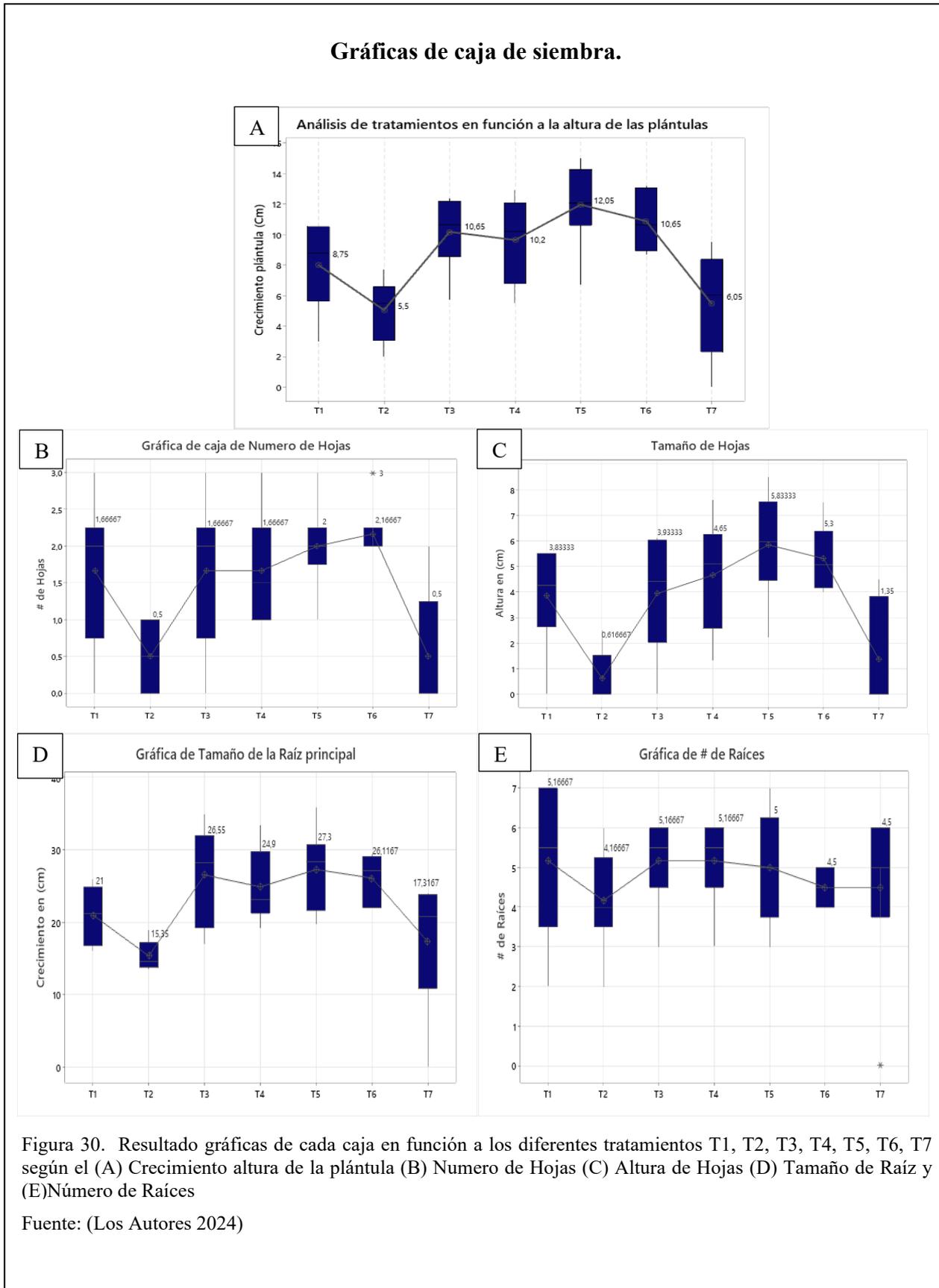
Prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
T2 - T1	-3,65	3,28	(-15,92; 4,62)	-1,12	0,608
T3 - T1	5,55	3,28	(-4,72; 15,82)	1,69	0,627
T4 - T1	3,90	3,28	(-6,37; 14,17)	1,19	0,894
T5 - T1	6,30	3,28	(-3,97; 16,57)	1,92	0,483
T6 - T1	5,12	3,28	(-5,15; 15,38)	1,56	0,709
T7 - T1	-3,68	3,28	(-13,95; 6,58)	-1,12	0,917
T5 - T2	11,20	3,28	(8,93; 21,47)	3,41	0,025
T4 - T2	9,55	3,28	(-0,72; 19,82)	2,91	0,082
T6 - T2	10,77	3,28	(7,68; 23,86)	3,26	0,014
T7 - T2	1,97	3,28	(-8,30; 12,23)	0,60	0,996
T4 - T3	-1,65	3,28	(-11,92; 8,62)	-0,50	0,999
T5 - T3	0,75	3,28	(-9,52; 11,02)	0,23	1,000
T6 - T3	-0,43	3,28	(-10,70; 9,83)	-0,13	1,000
T7 - T3	-9,23	3,28	(-19,50; 1,03)	-2,81	0,102
T5 - T4	2,40	3,28	(-7,87; 12,67)	0,73	0,990
T6 - T4	1,22	3,28	(-9,05; 11,48)	0,37	1,000
T7 - T4	-7,58	3,28	(-17,85; 2,68)	-2,31	0,269
T6 - T5	-1,18	3,28	(-11,45; 9,08)	-0,36	1,000
T7 - T5	-9,98	3,28	(-20,25; 0,28)	-3,04	0,061
T7 - T6	-8,80	3,28	(-19,07; 1,47)	-2,68	0,134

Figura 29. Prueba de Tukey en Tamaño de Raíz principal

Fuente: (Los autores, 2024)

4.11. Resultados gráficos de siembra.



La siembra se efectuó con la finalidad de medir los cambios observables que la plántula presentaba de acuerdo con los diferentes tratamientos tanto de los biofertilizantes a base de microalgas en diferentes concentraciones y un control químico, como se mencionó anteriormente los tratamientos fueron rotulados de T1 a T7 y los datos obtenidos se registraron al onceavo día después de su siembra. Se comparó estadísticamente la media de los datos obtenidos y se determinó si existe diferencia significativa o no mediante el uso de la herramienta ANOVA por Software MiniTab Statistical, en base a esto se obtuvo que para el crecimiento de la plántula midiendo su altura en (cm) con un valor de p (0,000) y para el crecimiento de la raíz en (cm) con un valor de p (0.002) podemos definir que si existe diferencia significativa al ser ($p > 0.05$) cómo podemos observar en la gráfica de caja de la Figura 30(A). y Figura 30 (D) el tratamiento T5 y T6 presenta las medias más altas, al igual que las características observadas en el laboratorio fueron que tanto las plántulas como su raíz alcanzaron un mayor crecimiento como se observa en las fotografías del Anexo 9.

En cuanto, al número de raíces se obtuvo que estadísticamente no existió diferencia significativa ($p > 0,05$) y el diagrama de caja Figura 30 (E) nos proporciona una simetría general en la distribución de datos, por otro lado, visualmente se obtuvo que a pesar de ver diferencia en el tamaño al presentar el maíz una raíz fasciculada el número de raíces fue muy similar como indica las fotografías del Anexo 9.

Finalmente, al analizar la altura de hojas y el número de hojas de las plántulas estadísticamente si existió diferencia significativa ($p < 0,05$) y como se observa en la Figura 30 (B) y (C) en el diagrama de caja la media de los tratamientos 5 y 6 presentan los valores más altos y existe una menor dispersión de los valores mínimos y máximos.

5. Conclusiones

- Se identificó y aisló con éxito los microorganismos *Chlorella* sp. y *Nostoc* sp. mediante el uso del microscopio óptico, junto con la ayuda de claves dicotómicas específicas para cada especie.
- Se evidenció que para el cultivo de *Chlorella* sp, el mejor Medio de cultivo a utilizar fue el de Basfoliar + Urea en comparación al Medio sin urea, debido a que presentó mayor crecimiento celular, lo cual fue medido a través de la cámara de Neubauer en un lapso de 7 días.
- Se puede separar biomasa de un cultivo de microalgas de *Chlorella* sp con un porcentaje aceptable desde una velocidad angular de 1000 RPM, obteniendo un rendimiento de 83.33% y logrando alcanzar un máximo rendimiento de 97.31% con una velocidad angular de 3500 RPM.
- El mejor método de separación de biomasa para *Chlorella* sp fue la centrifugación, recuperando un volumen mayor a comparación con la filtración y decantación, con una notable diferencia en el tiempo total empleado y sin registrar daño celular comprometedor.
- El aislamiento de *Nostoc* sp. fue el proceso más complejo debido a la presencia de un consorcio de cianobacterias, por lo que no fue posible obtener un cultivo puro para su escalado.
- Los análisis de varianza demostraron que los biofertilizantes a base de microalgas tienen un impacto significativo en varios aspectos del desarrollo de las plántulas de maíz. Los tratamientos T5 y T6 se destacaron consistentemente en cuanto a la germinación de semillas, el crecimiento en altura, el número de hojas y el tamaño de las hojas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de raíces. Por otro lado, el tamaño de la raíz principal también mostró diferencias significativas, con T5, T3 y T6

siendo los más efectivos. Estos hallazgos sugieren que ciertos biofertilizantes pueden ser más beneficiosos para promover el desarrollo integral de las plántulas de maíz.

- Los resultados de la prueba de Tukey indicaron que los tratamientos T1 y T4 fueron los más efectivos para la germinación de semillas, mientras que T5 y T6 se destacaron en términos de crecimiento en altura, número de hojas y tamaño de las hojas. En cuanto al tamaño de la raíz principal, los tratamientos T5, T3 y T6 mostraron un impacto significativo, finalmente se demostró que no se encontraron diferencias significativas para el uso de biofertilizantes con relación al número de raíces presentes en el crecimiento de plántulas de maíz.

6. Recomendaciones

- Se recomienda aplicar velocidades angulares mayores a la establecidas en este trabajo, ya que se puede alcanzar un rendimiento mayor de separación de la biomasa microalgal para utilizarlo como biofertilizante.
- Según los resultados obtenidos en el procedimiento de siembra de *Nostoc* sp, es recomendable realizar el escalado de la especie en Medio sólido sin ninguna fuente nitrógeno.

7. Bibliografía

- Abril, Z. (2022). *Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos obtenidos de Scenedesmus sp.*
- Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., & Morales, E. D. (2009). Biomass production of microalga Scenedesmus sp. with wastewater from fishery. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 32(2), 126–134.
- Andrade, F., Otegui, M. E., Cirilo, A., & Uhart, S. (2023). *Ecofisiología y manejo del cultivo de maíz* (Vol. 1).
- APCSA. (2021). Covid y Post-Covid aporte de empresas APCSAs. *Asociación de La Industria de Protección de Cultivos y Salud Animal*, 8–16. www.apcsaecuador.org
- Arizmendi Martínez, O., Lujan, D., Lorenzo Rojas, E., Martínez, N. M., Suarez Padrón, I., Atencio García, V., Yirlis Yadeth, P.-R., Alfredo, J.-O., & Juan de Dios, J.-N. (2023). *Cultivo de cianobacterias: aspectos prácticos.*
- ArtisMicropia. (2023). *Foto Chlorella.*
- Aveiga Ortiz, A. M., Cobeña Navarrete, H. M., Pinargote Zambrano, C. A., Tinoco Gómez, O. R., & Alcántara Boza, F. A. (2021). Educación ambiental para la disminución del uso de agroquímicos en la comunidad Balsa en Medio (Ecuador). *Revista Del Instituto de Investigación de La Facultad de Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 24(48), 27–33. <https://doi.org/10.15381/iigeo.v24i48.20481>
- Barreno, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). *Claves para la identificación de los géneros.*
- Bolívar Galiano, F. C., & Sánchez Castillo, P. M. (1999). Claves de identificación de microalgas frecuentes en monumentos. *Revista PH*, 93. <https://doi.org/10.33349/1999.26.769>
- Bonillas, S., Aubriot, L., Haakonsson, S., Illarze, M., Díaz, I., & Brena, B. (2021). Las floraciones de cianobacterias tóxicas comprometen el uso del agua del Río Negro, Uruguay. *INNOTECH*, 22. <https://doi.org/10.26461/22.08>
- Cabrera, C. (2016). *Evaluación comparativa de dos tipos de floculantes para la cosecha de biomasa de microalgas a escala piloto.*
- Cadena, M., Molina, D., Carvajal, A., Ontaneda, D., & Morales, Y. E. (2013a). Bioprospecting study of Nostoc sp. macrocolonies in the Ecuadorian Andes. *ACTA BOT. VENEZ*, 36(2), 287–307.
- Cadena, M., Molina, D., Carvajal, A., Ontaneda, D., & Morales, Y. E. (2013b). Bioprospecting study of Nostoc sp. macrocolonies in the Ecuadorian Andes. *ACTA BOT. VENEZ*, 36(2), 287–307.
- Casá, N. E., & De Escalada, M. (2020). Optimización de la concentración de inóculo y pH del medio de cultivo, para aumentar la producción de Chlorella vulgaris en suero de ricota. *AJEA*, 5. <https://doi.org/10.33414/ajea.5.783.2020>
- Caviedes, M., Gangotena, D., Albán María, & Pantoja, J. (2023). Respuesta del cultivo de maíz (Zea mays L. variedad INIAP-101) a la fertilización química y riego. *II Simposio de Manejo y Fertilización de Suelos*, 39–40. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15690.34242>
- Chico-Ruiz, J. (2023). Alternativas de mejora en la agricultura: Microalgas como bioestimulante. *Sagasteguiana*, 11(1), 1–2. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/5563>

- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 42, e37320. <https://doi.org/10.1590/FST.37320>
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. In *Food Science and Technology (Brazil)* (Vol. 42). Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>
- Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, 128, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.061>
- Galetovic, A., Araya, J. E., & Gómez-Silva, B. (2017). Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc sp. Llayta*. *Revista Chilena de Nutricion*, 44(4), 360–370. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400360>
- Gallego Albiach, I., Igualada, P., & María, L. (2020). *Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento*.
- García Vásquez, G. E., Álvarez Sánchez, A. R., & Yáñez Cajo, D. J. (2023). Efecto agronómico y productivo de la biofertilización a base de microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Chlorella vulgaris* en el cultivo de maíz (*Zea mays L.*) en Pueblo Viejo, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 16(1), 43–51. <https://doi.org/10.18779/cyt.v16i1.699>
- Gómez, L., Tormos, L., & Ortega, Y. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura [UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN]. In *Tecnología Química* (Vol. 42, Issue 1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852022000100070&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- González-Delgado, Á. D., Barajas-Solano, A. F., & Ardila-Álvarez, A. M. (2017). Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 451–461. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:736
- González-Pérez, B. K., Rivas-Castillo, A. M., Valdez-Calderón, A., & Gayosso-Morales, M. A. (2022). Microalgas as biostimulants: a new approach in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03192-2/METRICS>
- Guamán Guamán, R. N., Desiderio Vera, T. X., Villavicencio Abril, Á. F., Ulloa Cortázar, S. M., & Romero Salguero, E. J. (2020). Evaluación del desarrollo y rendimiento del cultivo de maíz (*Zea mays L.*) utilizando cuatro híbridos. *Siembra*, 7(2), 047–056. <https://doi.org/10.29166/siembra.v7i2.2196>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. In *Revista de Biología Marina y Oceanografía* (Vol. 49, Issue 2, pp. 157–173). Universidad de Valparaiso. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Herrera Pérez, R. M. (2012). *Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria Nostoc sp. como sustrato en la producción de bioetanol*. Universidad Nacional de Colombia.
- Herrera, S. (2020). *Cultivo de microalga Chlorella sp en un fotobiorreactor para la obtención de biodiesel*.

- iNatura. (2024, March 24). *Nostoc sp.* Cianobacteria Nostoc. <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/67332-Nostoc>
- iNaturalistEc. (2024). *Nostoc sp.* <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/67332-Nostoc>
- INEN. (2013). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2078:2013 Plaguicidas y productos afines de uso agrícola. Manejo y disposición final de envases vacíos tratados con triple lavado.*
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular. *Avances En Ciencia e Ingenierías*, 3(2), 159–164. http://www.exedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/159
- Jacob-Lopes, E., Manzoni Maroneze, M., Isabel Queiroz, M., & Queiroz Zepka, L. (2020). *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer and Bioactive Compounds.*
- Santaclara, J. (2017). *MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA ESPECIALIDAD: INVESTIGACIÓN CLÍNICA DIFERENTES ESPECIES DE LA MICROALGA CHLORELLA COMO COMPLEMENTO DIETÉTICO: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA.*
- Maldonado Venegas, T. A. (2023a). *Microalgas como fuente de bioestimulantes agrícolas: una revisión.* <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/11556>
- Maldonado Venegas, T. A. (2023b). *Microalgas como fuente de Bioestimulantes Agrícolas: Una revisión.* Universidad de Concepción .
- Mendoza, J. E. (2021). *¿Conoces a las Cianobacterias Nostoc?*
- Mera, S. (2015). *OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE CENTRIFUGACIÓN PARA SEPARAR BIOMASA PROVENIENTE DE MICROALGAS.* Universidad Central del Ecuador.
- Mountourakis, F., Papazi, A., & Kotzabasis, K. (2021). The microalga *Chlorella vulgaris* as a natural bioenergetic system for effective CO₂ mitigation—new perspectives against global warming. *Symmetry*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/sym13060997>
- Muentes-Rodríguez, R. B., Montilla-Pacheco, A. de J., & Pacheco-Gil, H. A. (2023). Importancia de la agroecología en la mitigación de impactos ambientales derivados del uso de agroquímicos en Ecuador. *Revista de Ciencias Agropecuarias ALLPA*, 6(12), 25–39. <https://doi.org/10.56124/allpa.v6i12.0062>
- Naranjo, A. (2020). El gatopardismo en el campo: Soberanía alimentaria y la omnipresencia de los plaguicidas altamente peligrosos. In *Cambio climático, biodiversidad y sistemas agroalimentarios: avances y retos a 10 años de la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria en Ecuador* (pp. 233–244). Editorial Abya-Yala. <https://doi.org/10.7476/9789978105689.0014>
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Ríos, S., Rey, M., Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2014). Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation. *Bioresource Technology*, 163, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.009>
- Ortiz-Moreno, M. L., Sandoval-Parra, K. X., & Solarte-Murillo, L. V. (2019). *Chlorella*, ¿Un potencial biofertilizante? *Orinoquia*, 23(2). <https://doi.org/10.22579/20112629.582>
- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020a). Biofertilization with chlorophyta and cyanophyta: An alternative for organic food production. In *Acta Biologica*

- Colombiana* (Vol. 25, Issue 2, pp. 303–313). Universidad Nacional de Colombia.
<https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.77183>
- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020b). Análisis de la producción de biomasa de *Nostoc muscorum* en sistema hidropónico. *Orinoquia*, 24(1), 23–31.
<https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020c). Analysis of *Nostoc muscorum* biomass production in a hydroponic system. *Orinoquia*, 24(1), 23–31.
<https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Palacio Gómez, K., Hernández Atilano, E., Peñuela Mesa, G., Aguirre Ramirez, N., & Vélez Macías, F. (2019). Morphological characteristics of cyanobacteria and dominant phytoplankton in reservoirs in Antioquia: A focus based in biovolume. *Revista U.D.C.A Actualidad and Divulgacion Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1306>
- Quinto Hidalgo, E. J. (2021). *Sobrevivencia del “Nostoc sp” cultivado a diferentes parámetros productivos en cultivo in vitro*. UNAM.
- Rad, C., Marks, E. A., Pérez-Alonso, D., Montero, O., & Hernandez, M. (2022). Cambios en la microbiota del suelo inducidos por la aplicación de biofertilizantes con microalgas. *Compostaje: Objetivo de Desarrollo Sostenible, 2022, ISBN 978-84-09-44506-6, Págs. 69-72*, 69–72.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9164144&info=resumen&idioma=SPA>
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572018000100075>
- Reyes Palomino, S. E., & Cano Ccoa, D. M. (2022). Efectos de la agricultura intensiva y el cambio climático sobre la biodiversidad. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 24(1), 53–64. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.328>
- Rippka, E., Deruelles, J., & Waterbury, N. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 111).
- Rodríguez Gómez, C. F., & Aké Castillo, J. A. (2019). ¿Sedgwick-Rafter o Sedgewick-Rafter? Una aclaración sobre el nombre de la cámara de conteo. *ResearchGate*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34230.96324>
- Romero Torres, N., & Sandoval Herrera, J. A. (2024). Biofertilizante a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Mutis*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.21789/22561498.2048>
- Salazar Carranza, L. F., Véliz Zamora, D. V., Mestanza Uquillas, C. A., & Villacís Seme, J. Y. (2023). Respuesta agronómica de un híbrido de maíz (*Zea mays* L.) a diferentes densidades de siembra. *Ciencia y Tecnología*, 16(2), 17–24. <https://doi.org/10.18779/cyt.v16i2.661>
- Sanchez Araujo, V. G., Chávez Araujo, E. R., Romero Taboada, Y., Rojas Felipe, E., & Alvarez Tiellasuca, A. (2021). Evaluación del rendimiento y tasa de crecimiento de *Nostoc Sp.* en condiciones de Laboratorio, Huancavelica - 2020. *Llamkasun*, 2(4), 41–51.
<https://doi.org/10.47797/llamkasun.v2i4.63>
- Sandoval-Guerrero, F., & Peña-Vélez, V. (2023). *INCIDENCIA DE LA IMPORTACIÓN DE UREA EN EL SECTOR AGRÍCOLA DEL ECUADOR*. <https://doi.org/10.24133/n63c9f44>

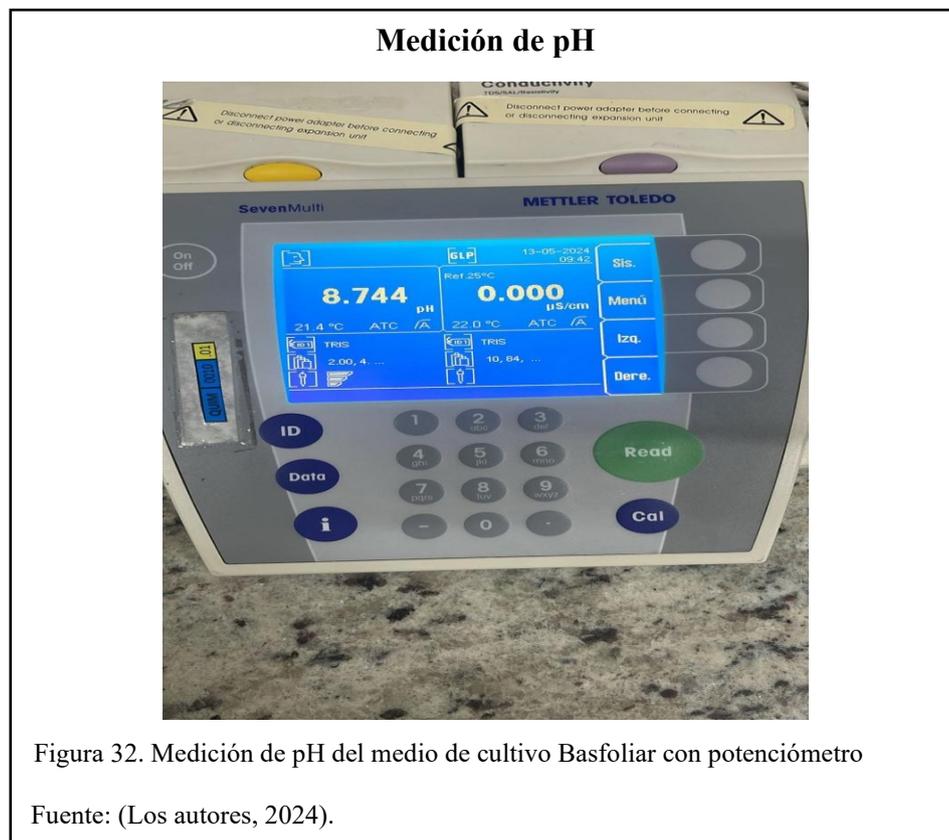
- Soto, G., Yelitza, G.-O., Ana, S. G., Edgar, T. G., Borges Juan, B., & Rodríguez Duilio, T. (2020). *PROPUESTA DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE FERTILIZANTE ORGÁNICO A PARTIR DE MICROALGAS*. 1(14), 92–109.
- Soto Pacheco, S., & Alcántara Garduño, M. (2022). *Determinación de consecuencias ocasionadas por la explosión de nitrato de amonio en Celemania, Coahuila*. <http://revistatediq.azc.uam.mx>Año8
- Tejada, J., Condore Medrano, F., Vilcara Cárdenas, E., Díaz Ramírez, P., & Tobaru, J. (2024). Glifosato y fertilizantes nitrogenados para controlar Sorghum halepense (L.) Pers. en dos épocas. *Revista Alfa*, 8(22), 20–28. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i22.244>
- Tenorio, R., & Añazco, J. (2022). *EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN INYECTADA EN EL CULTIVO DE ABACÁ (Musa textilis)*. <http://tsachila.edu.ec/ojs/ind>
- Tonatiuh Sánchez-Navarrete, E., Dolores Castañeda-Antonio, M., Baez, A., & Morales-García, Y. E. (2021). *Rizobacterias para el mejoramiento del cultivo de maíz (Zea mays). Una tecnología prometedora para la producción de maíces criollos*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5501662>
- Torres, N. R., & Herrera, J. A. S. (2024). Biofertilizante a partir de Chlorella vulgaris. *Revista Mutis*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.21789/22561498.2048>
- Varela, S. A., & Arana, V. (2011). *Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos*.
- Viana, C. (2022). *Study of the biopesticide and biostimulant activity of microalgae in horticultural species*.
- WWW.MINITAB.COM INFORME TÉCNICO SOBRE EL ASISTENTE DE MINITAB*. (n.d.).
- Zheng, M., Ji, X., He, Y., Li, Z., Wang, M., Chen, B., & Huang, J. (2020). Simultaneous fixation of carbon dioxide and purification of undiluted swine slurry by culturing Chlorella vulgaris MBFJNU-1. *Algal Research*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101866>

8. Anexos

Anexo 1. Fotografías de Matraces Erlenmeyer con crecimiento de *Chlorella* sp.



Anexo 2. Medición de pH



Anexo 3. Medio BG11



Anexo 4. Fertilizante químico 10-30-10



Anexo 5. Recolección de la biomasa de *Nostoc* sp

Muestra de *Nostoc* sp



Figura 35. Recolección en campo de la biomasa de *Nostoc* sp.

Fuente: (Los autores, 2024).

Anexo 6. Siembra con los diferentes tratamientos.

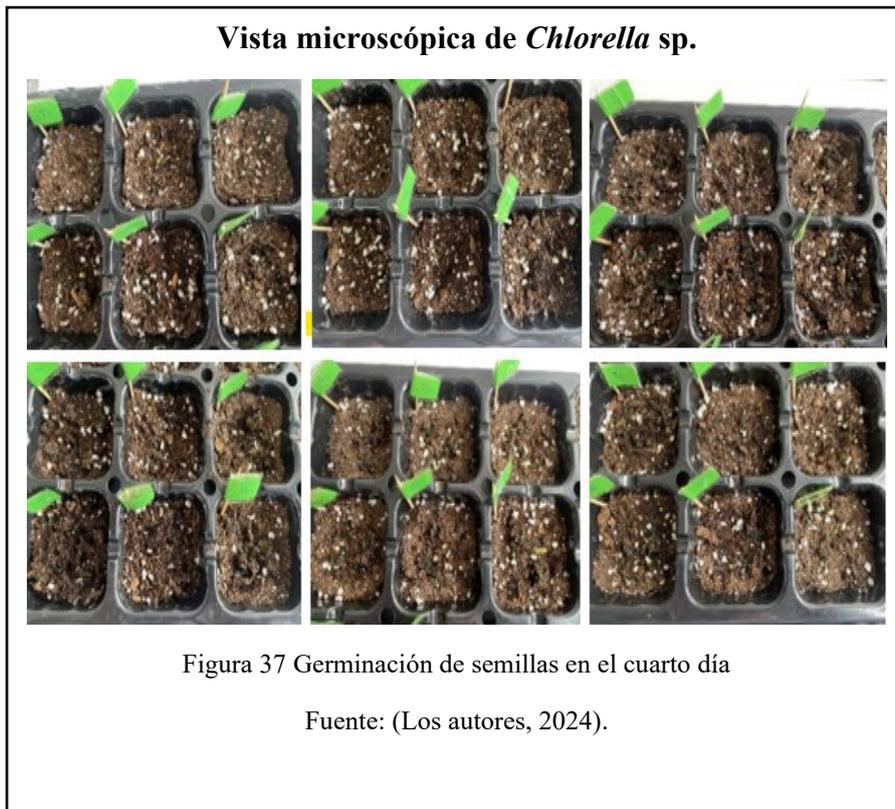
Semilleros con semillas de maíz



Figura 36. Siembra inicial de semillas con los biofertilizantes.

Fuente: (Los autores, 2024).

Anexo 7. Inicio de germinación en los diferentes tratamientos al 4to día.



Anexo 8. Semillas germinadas al 7mo Día.



Anexo 9 Evaluación de plántulas sometidas a diferentes tratamientos.

