



**INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE HUATUSCO**

**EVALUACION DE TRATAMIENTOS
BIOLÓGICOS (PROBIÓTICOS Y MICROALGAS) EN
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y GANADEROS**

OPCIÓN DE TITULACIÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTA:

ISAIAS NICOLAS ELVIRA JIMENEZ

ASESOR DE TESIS:

DR. JESÚS ATENODORO ALONSO

CO-ASESOR

DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

HUATUSCO, VERACRUZ

MAYO 2025

RESUMEN

Palabras clave: Microalgas, Residuos Agroindustriales, *Lactobacillus casei*, *Nanocloropsis Oculata*.

En el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad realizar los estudios pertinentes en los residuos ganaderos y agroindustriales, en el cual se buscó la biotransformación la materia orgánica para su biotransformación en un elemento redituable haciendo uso de microorganismos, en este caso tanto probióticos como microalgas las cuales fueron: *Lactobacillus Cassei* y *Nanocloropsis Oculata* siendo estos los principales catalizadores para el proceso de biotransformación, además de ser sujetos de análisis en los parámetros físico-químicos y biológicos, esto con la finalidad de observar su desarrollo en el medio logrando cumplir con las metas establecidas. Para ello se emplearon fotobiorreactores anaerobios, en el caso del probiótico, (Residuo Cervecerero Artesanal) se utilizaron diversas concentraciones: 5%, 10% y 15% del agente microbiano, esto se debe a la naturaleza del mismo el cual es requerido para su proceso fermentativo en durante un periodo de 72hrs se registró un consumo en los carbohidratos, aparte las biomásas generadas al final del tratamiento biológico, se observó un gran aumento en los niveles de nitrógeno, lo que indica que durante el proceso fermentativo puede ser transformado aumentado los macroelementos que posee. Posterior a la ejecución de las técnicas desarrolladas se determinó que en los residuos de origen ganadero (Residuo Bovino) se utilizaron los fotobiorreactores tipo Batch en diversas concentraciones: 15%, 30% y 45%. Durante el análisis biológico se registró una alta concentración de coliformes fecales en el medio, el cual a su vez se estableció que el pH posee una media de 7.75, además de poseer niveles imperceptibles de Nitrógeno (N), inclusive con las inusuales concentraciones determinadas se obtuvo un crecimiento celular elevado durante un lapso de (21) veintiún días , el cual se establece el cumplimiento de los objetivos establecidos en el trabajo realizado, El residuo agroindustrial el sustrato poseía altos niveles de carbohidratos (CH_2O), nitrógeno (N), y proteínas, convirtiéndose un medio adecuado para su actividad microbiológica.

ABSTRACT

Keywords: Microalgae; Agro-industrial residues *Lactobacillus casei*; *Nannochloropsis Oculata*

The purpose of this research was to carry out the pertinent studies on livestock and agro-industrial residues, aiming to bio transform the organic matter into a value-added product by employing microorganisms—both probiotics and microalgae, namely and *Nannochloropsis Oculata* as the primary catalysts of the biotransformation process. Additionally, these biocatalysts were analyzed under various physicochemical and biological parameters to monitor their development in the culture medium and meet the established targets. Anaerobic photobioreactors were used for the probiotic fermentations with craft brewery waste, testing microbial inoculum levels of 5 %, 10 % and 15 % (v/v). Over a 72-hour period, a significant consumption of carbohydrates was recorded, and the resulting biomasses exhibited an increase in nitrogen content, indicating enhanced macronutrient availability through the fermentative transformation.

For the livestock residue trials (bovine waste), batch-type photobioreactors were operated at 15 %, 30 % and 45 % (v/v) concentrations. Biological analyses over 21 days showed high initial levels of fecal coliforms, a stable pH averaging 7.75, and negligible nitrogen levels in the untreated medium. Despite these conditions, robust algal growth was achieved, fulfilling the study's objectives. The agro-industrial substrate provided a rich medium of carbohydrates, nitrogen and proteins, making it highly suitable for microbial cultivation.

DEDICATORIAS

A mis Padres Magdalena Jiménez Hernández y Nicolás Elvira León por darme la oportunidad de vivir este maravilloso mundo además de alentarme a nunca rendirme, siempre inculcándome los valores que caracteriza a un ser humano.

A mi hermano Diego Enrique Elvira Jiménez por apoyarme en los buenos y malos momentos que se han presentado.

A mis Abuelos Fausto Jiménez Pérez y Raquel Jiménez Hernández por haber fungido como mis segundos padres siempre agradecidos por todo el amor brindado y socorrerme en tiempos de debilidad.

A mi Tía Laura Jiménez Hernández por haberme apoyado desde que era un niño cuidándome y velando por mi seguridad.

A mis Gatos Kiwi y Celeste que con un amor y lealtad incuestionable me brindan su amor siempre donde quiera que esté.

A mi mejor Amigo Arturo Gómez Rojas el cual le agradezco una amistad que jamás pensé tener junto con todas las aventuras que hemos vivido será remplazada por nada en el mundo.

A mi Tía Teresa Liliana Acosta Barrientos quien le guardo un cariño y amor único que siempre me apoya y anima a seguir cumpliendo las metas y desafíos presentados.

A mi Prima Arianna Dalay Zavala Acosta quien la considero una hermana donde a pesar de las dificultades presentadas ha demostrado ser una gran persona y siempre tendrá un lugar especial para mí.

Y a todas las personas que eh conocido a lo largo de mi vida y que conoceré en un futuro quienes me han enseñado una parte de este mundo el cual ya sea por muy poco o largo el tiempo, cada experiencia adquirida, brindada y compartida ha sido única eh inigualable lo agradezco profundamente gracias.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco al a mi Asesor del Instituto Tecnológico de Orizaba (ITO) al Doctor Juan Manuel Méndez Contreras, por haberme recibido en su laboratorio para el desarrollo del trabajo de investigación, que he llevado a cabo con esfuerzo y dedicación.

Al Dr. Jesús Atenodoro Alonso, por su amistad, confianza y motivación en momentos de dificultad, el cual me ha dado la oportunidad de realizarme como profesionalista.

Al M.C. Joaquín Estrada García por la confianza de trabajar a su lado, la amistad mutua de colaborar en el trabajo realizado, los consejos otorgados y a su conocimiento.

Al M.C. Roger Emmanuel Sales Pérez por su amistad incondicional, la motivación para concluir el trabajo realizado y su guía para orientarme.

A la M.C. Itzel Diaz Gonzáles por brindarme su apoyo moral, su guía, por instruirme en el desarrollo de las técnicas y el voto de confianza brindado para trabajar en un proyecto de gran importancia.

A la M.C. Sol María Mandí Pérez Guzmán por auxiliarme en el desarrollo del trabajo propuesto, la amistad y confianza que me ha brindado.

A la Doctora Viviana Rodríguez Rivera, por haberme auxiliado en múltiples ocasiones, por su asesoría para la correcta ejecución de las técnicas de laboratorio y brindarme su amistad.

Al Ing. Químico Uriel Carmona por la amistad formada como colegas de laboratorio dentro del área, el cual gracias a sus asesoramientos se logró culminar el trabajo presentado

En general agradezco a todo el equipo del laboratorio de ambiental II por la confianza y el apoyo brindado para la culminación del trabajo realizado, el cual fue de suma importancia su colaboración al igual de su gran y amplia experiencia el poder culminar el trabajo propuesto.

Índice

Capítulo I: INTRODUCCION.....	14
1.2 Planteamiento del Problema.....	16
1.3 Justificación	17
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo General	18
1.4.2 Objetivos Específicos	18
CAPITULO II: MARCO TEORICO	19
2.1 Marco Teórico Referencial.....	19
2.3 Marco Teórico Conceptual.....	25
2.4 Marco Teórico	30
CAPITULO III: METODOLOGIA	37
3.1 Acondicionamiento de la muestra	37
3.2 Organismos	37
3.3 Parámetros Físicos: Solidos Totales	38
3.4 Parámetros Físicos: Solidos Totales Volátiles	39
3.5 Parámetros Físicos: pH	39
3.6 Parámetros Químicos: Determinación de Carbohidratos por el Método de Antrona – Sulfúrico.....	40
3.6.1 Metodología de la determinación de carbohidratos; Acido - Antrona	40
3.7 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O.) Por Micro- Método (Técnica Colorimetría).....	41
3.8 Determinación de Nitrógeno Total Kjeldahl (Proteínas)	42
3.9 Determinación de Fosforo (Método 4500-PB 4. Digestión con Ácido Sulfúrico- Ácido Nítrico)	44

3.10 Parámetros biológicos: Determinación de coliformes fecales (NOM004-SEMARNAT-2002)	45
3.10.1 Preparación de caldo lactosado con púrpura de bromocresol	46
3.10.2 Preparación del medio EC	46
3.10.3 Solución tampón A	47
3.10.4 Solución tampón B	47
3.10.5 Agua de dilución	47
3.11 Conteo Celular	47
3.12 Inoculación de <i>Lactobacillus Cassei</i>	48
3.13 Desarrollo de las cinéticas de bioconversión Anaerobia con el uso de Probióticos	49
3.14 Desarrollo de las cinéticas de Bioconversión Aerobia con el uso de Microalgas	50
3.15 Determinación de Biomasa micro algal	51
3.16 Determinación de Biomasa probiótica.....	51
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION	53
4.1 Tratamiento del residuo a partir del probiótico <i>Lactobacillus casei</i>	53
4.2 Tratamiento a partir de la Microalga <i>Nanocloropsis Oculata</i>	59
4.3 Conteo Celular de la microalga <i>Nanocloropsis Oculata</i> y del <i>Lactobacilo Lactobacillus Casei</i>	70
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFIA.....	74

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Microalga Nanocloropsis Oculata	28
Ilustración 2 Lactobacillus casei	29
Ilustración 3: Estructura química del compuesto Antrona	40
Ilustración 4: Diagrama del desarrollo experimental del Lactobacillus Cassei.	53
Ilustración 5: Conteo del Lactobacilo utilizando la cámara de Neubauer Utilizando el objetivo 100x complementado con aceite de inmersión.	54
Ilustración 6: Desarrollo de la cinética anaerobia del lactobacilo L Cassei en sus diversas concentraciones (5%, 10% y 15%) utilizando un agitador orbital.....	55
Ilustración 7: Digestión de muestras utilizando el método de Baño María para la determinación de carbohidratos	55
Ilustración 8: Desarrollo experimental de la microalga Nanocloropsis Oculata.	59
Ilustración 9: Microalga Nanocloropsis Oculata observada desde un microscopio usando el objetivo 40X durante el conteo celular en cámara de Neubauer	60
Ilustración 10: Fotobiorreactores tipo Batch durante el desarrollo celular inicial de la microalga Nanocloropsis Oculata (Dia0).	61
Ilustración 11: Desarrollo de la Microalga Nanocloropsis Oculta (Dia 7)	61
Ilustración 12: Desarrollo de la microalga Nanocloropsis Oculata (Dia 14)	63
Ilustración 13: Dia final de desarrollo de la microalga Nanocloropsis Oculata (Dia 21)	63
Ilustración 14: Espectrofotómetro (Thermo Genesys 20), utilizado para la medición de absorción de las muestras de interés.	65
Ilustración 15 Muestras posterior a digestión habiendo usado la placa de calentamiento (Muestras de D.Q.O. lado izquierdo, Blanco ubicado en el centro, Muestras de D.Q.O. Soluble lado derecho.....	65
Ilustración 16: Placa de calentamiento (Felisa), utilizada para el desarrollo de la técnica de determinación de D.Q.O, para la digestión de las muestras de interés	66
Ilustración 17: Ejecución de la metodología de determinación de Fosforo en muestra de residuo Bovino	68

Ilustración 18: Preparación de reactivo combinado para la determinación de Fosforo, previo a la medición de absorbancia mediante el uso del Espectrofotómetro.	69
Ilustración 19: Esquema de la Cámara de Neubauer, indicando la zona designada para la realización del conteo celular.	70
Ilustración 20: Zona central de la cámara de Neubauer	71
Ilustración 21: Microscopio Zeiss Primo Star, UNAM 02504632, empleado para el conteo celular de los agentes biológico.	71

INDICE DE GRAFICOS

Gráficos 1: Desarrollo del L Cassei en una concentración al 5% del inoculo.....	56
Gráficos 2: Desarrollo del L Cassei en una concentración al 10% del inoculo.....	56
Gráficos 3: Desarrollo del L Cassei en una concentración al 15% del inoculo.....	57
Gráficos 4: Niveles de Nitrógeno y proteínas previo y posterior al desarrollo de la cinética.....	58
Gráficos 5: Porcentajes de Sólidos Totales, Sólidos Totales Volátiles y pH de la cinética anaeróbica del L Cassei.....	58
Gráficos 6: Desarrollo de la Microalga Nanocloropsis Oculata.....	62
Gráficos 7: Monitoreo de pH de la cinética de la microalga Nanocloropsis Oculata.....	62
Gráficos 8: Sólidos Totales generados de la cinética de la microalga Nanocloropsis Oculata.....	64
Gráficos 9: Sólidos Totales Volátiles de la cinética de la microalga Nanocloropsis Oculata.....	64
Gráficos 10: Niveles de DQO de la cinética de la microalga Nanocloropsis Oculata.....	67
Gráficos 11: Niveles de DQO Soluble de la cinética de la microalga Nanocloropsis Oculata.....	67
Gráficos 12: Niveles de Fósforo de la biomasa microalgal generada.....	68

INDICE DE TABLAS INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparativo de las características de los sistemas de cultivo de microalgas abiertos y cerrados (Carvalho-etal,2011).	21
Tabla 2: Características físicas, químicas y microbiológicas de los sustratos para el cultivo de L. Cassei (Garcinia Madruno).	24
Tabla 3: Métodos de análisis empleados.	37
Tabla 4: Caracterización fisicoquímica del residuo cervecero artesanal.	48
Tabla 5: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del residuo bovino.	50
Tabla 6: Resultados de la determinación de coliformes fecales en base a las biomasa mico algales generadas en sus diferentes concentraciones (15% y 45%).	69

Capítulo I: INTRODUCCION

La Agroindustria es una de las industrias que emplea diversas materias primas ya sea de origen vegetal o animal, de las cuales se enfocan en la manufacturación de estas en productos para su comercialización, ya sean en productos alimenticios, fármacos, cosméticos, etc. A su vez dentro de sus procesos se generan residuos de diversos orígenes a los cuales requieren tratamientos ya sean químicos, físicos o biológicos, con la finalidad de minimizar el impacto que se genera en el ambiente. Por lo cual es crucial el manejo adecuado de los residuos de esta índole, por lo que se debe considerar que los desechos sólidos y otros subproductos inciden directamente sobre el equilibrio medioambiental (Aguilar *et al.*, 2022).

Se ha implementado el uso de agentes biológicos, tal es el caso de la aplicación de probióticos o su alternativa el uso de microalgas como medio de biodegradación de los residuos agroindustriales de diversos orígenes (agrícolas, ganaderos, etc.). Los métodos basados en tratamientos biológicos representan una alternativa eficaz y económica que es posible utilizar para eliminar productos químicos nocivos y contaminantes en el medio ambiente.

En el presente estudio se seleccionaron dos tipos de microorganismos, como son la microalga *Nanocloropsis Oculata* y la bacteria probiótica *L. Casei*, considerando que se ha demostrado presentan un buen desempeño en la remoción de agentes contaminante además de generar biomasa con un gran valor de aprovechamiento como fuente de combustibles de tercera generación, parte de la misma biomasa puede utilizarse, como parte de los suplementos alimenticios para el consumo humano llegando a usarse en la elaboración de los productos fermentados como la cerveza, etc.

Las microalgas pueden considerarse como una fuente de energía prometedora, entre las principales razones es el bajo uso de agua en el cultivo, el alto rendimiento de biomasa por superficie en comparación con los cultivos; la posibilidad de utilizar tierras no agrícolas para el cultivo; utilización de residuos agroindustriales como fuente de nutrientes, por ejemplo, efluentes de cría de animales o vinaza (Menegazzo & Fonseca, 2019b).

Las microalgas son un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos, entre las características que presentan, sobresale su capacidad para sintetizar diferentes compuestos orgánicos esenciales que sirven de alimento a los diferentes organismos consumidores a lo largo de la cadena trófica, entre estos compuestos destacan los Omega 3 ácidos grasos poliinsaturados (v.g. los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA)) así como diferentes pigmentos (v.g. clorofilas y carotenoides, entre otros).

González, O. G. M. (2014b).

Por otro lado, los probióticos son microorganismos vivos presentes en los alimentos los cuales al ser ingeridos en cantidades suficientes pueden ejercer una actividad fisiológica específica, beneficiosa para la salud del individuo (González *et al.*, 2008).

Los cuales, para obtener su desarrollo celular, se ha requerido el uso de sustratos comerciales, sin embargo, con las nuevas tendencias e innovaciones el uso de los residuos agroindustriales junto con algunos de los sustratos fermentados, han conseguido abaratar los costos de producción como menciona Liliana y Misael, (2022).

Algunos microorganismos como lo son las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y algunas otras levaduras resultantes de estos procesos pueden tener aplicación en procesos fermentativos para la biotransformación de estos desechos lo cual se traduce en una disminución significativa de los elementos físicos o biológicos que puede llegar a poseer volviéndolo inclusive un medio de cultivo ideal para otros microorganismos benéficos para el ser humano

1.2 Planteamiento del Problema

La agroindustria genera una cantidad de residuos con una gran diversidad de caracteres, el cual la acumulación de estos a nivel global se estima que es de 2.000 millones (Singh et al., 2021).

El impacto que causan los residuos agroindustriales en la naturaleza es considerable, el cual abarca diversas áreas como son: agua (Contaminación de mantos acuíferos en la superficie terrestre junto con el subsuelo), aire (Emisión de gases de efecto invernadero como el CO₂ o gas Metano CH₄), suelo (Afectaciones a suelos destinados a las actividades agropecuarias convirtiéndolas en áreas de suelo infértil, entre otras, de tal manera que llegan a ser una fuente de contaminación de alto impacto en cantidades considerables debido a las características fisicoquímicas que presentan, así como agentes microbiológicos con una capacidad de infección considerable, lo cual es altamente riesgosa para la salud humana. Aunado a la acumulación de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) a los cuales no se les da un tratamiento adecuado para su disposición final.

Una de las alternativas y fuentes de oportunidad más novedosas, es el uso de biomasa procedentes de residuos agroindustriales con el enfoque a la producción de alimentos, medicamentos, biomateriales, generación de energías sostenibles (Freitas et al., 2021). Razón por la cual se pretende utilizar microorganismos probióticos y microalgas para la remoción de contaminantes, para darles un tratamiento del cual permite obtener una biomasa redituable con valor agregado, a partir del cual se generan subproductos con importantes aplicaciones para la industria.

De entre ellas surgen como una forma de ecotecnología el cual se destina a la producción de productos con orígenes biológicos (Rojas et al., 2022).

1.3 Justificación

Las actividades agroindustriales son fundamentales para satisfacer las necesidades básicas de la sociedad, sin embargo, derivan en la acumulación de grandes cantidades de desechos orgánicos, que como se mencionó anteriormente, provocan impactos severos en el medio ambiente (Batista *et al.*, 2020). México cuenta con una industria porcícola dinámica y en crecimiento, ya que se ubica entre los principales consumidores y productores de carne de cerdo en Latinoamérica, con una producción estimada de poco más de 1.73 millones de toneladas al cierre de 2022, 3 % más que en 2021 y se pronostica que para los próximos años el consumo continuará con el mismo ritmo de crecimiento impulsado por una mayor producción (SIAP, 2022).

La bioconversión de los residuos orgánicos surge como una alternativa factible, debido a la optimización dentro de las líneas de producción existentes, ya que no se limita únicamente en la disposición final de estos mismos, además aprovecha las propiedades aun presentes lo cual se abre una área de oportunidad con un margen de ganancia económico, pero una de sus cualidades más destacables por su capacidad para transformar los residuos orgánicos en productos de alto valor añadido, además de estabilizar la materia orgánica (Huang *et al.*, 2021).

La obtención de biomasas a través de la bioconversión aerobia de residuos orgánicos de origen porcícola mediante la microalga *Nannochloropsis Oculata*, se perfila como una tecnología económicamente atractiva y sostenible. Además de tener múltiples áreas de oportunidad en el mejoramiento, aprovechamiento e innovación de las técnicas y estrategias para la obtención y/o uso de probióticos, tal es el caso del *Lactobacillus Cassei*, la biomasa generada posee un alto valor nutricional, lo cual da pauta para el aprovechamiento en la elaboración de los productos alimenticios para el ser humano como lo son los suplementos para estos mismos destinados para el consumo animal en el área agropecuaria.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la degradación de compuestos orgánicos a partir de los residuos provenientes de la agroindustria, el cual se utiliza probióticos y microalgas cuya finalidad sea de degradar los elementos nocivos que generan un impacto significativo en el medio ambiente, junto con el análisis de sus rendimientos junto con la generación de una biomasa rica en nutrientes para su aprovechamiento ganadero.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del residuo agroindustrial de origen bovino y cervecero artesanal.
- Establecer las condiciones ambientales apropiadas, para el crecimiento de *Nannochloropsis Oculata* y *Lactobacillus casei* en residuos agroindustriales.
- Evaluar la calidad físico-química y microbiológica de la biomasa obtenida en el tratamiento de residuos agroindustriales para su reutilización.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1 Marco Teórico Referencial

Desde hace varias décadas la aplicación de probióticos en los procesos de biotransformación de materia orgánica de origen vegetal/animal ha sido una de las alternativas más llamativas para la producción de alimentos en base a la biomasa que producen los microorganismos, los productos elaborados en base a estos componentes llegan a poseer propiedades nutricionales con aprovechamiento para el cuerpo humano.

El alga se describe como un alga foto trófica, unicelular, no productora de zoosporas, que flota libremente y que tiene un diámetro de 2-4 μm , que crece de forma no axénica a una temperatura de 11-16 °C. Las células contienen cloroplastos parietales la cuales poseen una coloración amarillo verdoso (Kagan & Matulka, 2015).

Las Microalgas han sido usadas como medio para la producción de combustibles biológicos, (Biocombustibles) lo cual representa una gran área de oportunidad para las energías renovables o alternativas, consolidándose como una aplicación exitosa de las innovaciones en el sector energético, aperturando mayores áreas de oportunidad, lo cual permite alcanzar la sustentabilidad, convirtiéndose en parte importante de la economía circular. Debido a que, las microalgas son microorganismos que están presentes en los sistemas acuáticos con una gran diversidad de formas, características fisiológicas, nutricionales y genéticas que les permiten desempeñar un papel clave, en el establecimiento de ecosistemas, pueden ser explotados de manera sustentable, en procesos de biorremediación y como fuente de nutrientes (Menegazzo & Fonseca, 2019).

Uno de los medios de cultivo utilizados para el desarrollo inicial de las microalgas es el medio F/2 (Macronutrientes: NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl ; Micronutrientes: H_3BO_3 , MnCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) el cual se encuentra enriquecido con minerales para el óptimo crecimiento de estos microorganismos. El crecimiento poblacional de las

microalgas se puede dividir básicamente en seis fases: 1) de adaptación, 2) de aceleramiento, 3) de crecimiento exponencial, 4) de desaceleración o crecimiento lento, 5) de crecimiento estacionario y 6) de muerte (O. G. M. González, 2014b).

Por lo cual el uso de fotobiorreactores es uno de los medios que ofrecen múltiples ventajas a la hora de ser empleados a comparación de los sistemas tradicionales de producción en tanques, las cuales son un aumento en la densidad poblacional al estar completamente aislado de agentes externos, los costos para su implementación son menores a comparación de un sistema de tanque (Abierto) (Del Milagro Carvajal-Oses *et al.*, 2018).

Además en base a las características térmicas de la microalga reportado por Gárate Osuna 2022, la microalga además de ser una candidata de interés para la aplicación en sectores de bioenergía (específicamente para la obtención de biocombustibles como biodiésel, a base de las biomasas generadas), la cual se somete bajo un estrés térmico de 35 °C, lo cual representa un área de oportunidad para que ésta especie, sea capaz de escalar a gran escala, lo cual representa un paso para la optimización de recursos y permite que esta tecnología tenga un mayor alcance con una mayor factibilidad técnico-económica .

Tabla 1: Comparativo de las características de los sistemas de cultivo de microalgas abiertos y cerrados (Carvalho-
 eral,2011).

Características	Sistemas Abiertos	Sistemas Cerrados
<i>Relación área volumen</i>	Alta (4-10 veces mayor)	Baja
<i>Especies de algas</i>	Restringida	Flexible
<i>Criterio para selección de especie</i>	Competencia por crecimiento	Resistencia al esfuerzo
<i>Densidad de la Población</i>	Baja	Alta
<i>Eficiencia de la cosecha</i>	Baja	Alta
<i>Periodo de cultivo</i>	Limitada	Extendido
<i>Contaminación</i>	Posible	Poco Probable
<i>Perdida de agua por evaporación</i>	Posible	Prevenible
<i>Eficiencia de utilización de la luz</i>	Pobre	Excelente
<i>Transferencia de gases</i>	Pobre	Alta
<i>Control de Temperatura</i>	Ninguno	Excelente
<i>Variable más Costosa</i>	Mezcla de agua	Control oxígeno, temperatura
<i>Capital de Inversión</i>	Bajo	Alto

En el caso del grupo de probióticos (LCG), compuesto principalmente por las especies estrechamente relacionadas del género *Lactobacillus*, se pueden mencionar *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, siendo *Lactobacillus casei* una de las especies más estudiadas debido a su potencial comercial, industrial y de salud aplicada (Hill *et al.*, 2018).

De entre estas se ha analizado su uso en otros productos fermentados, según lo establecido por Wang *et al.*, 2021. El utilizo este mismo probiótico para la

fermentación de proteína de suero y jugo de arándano, el cual se utilizaron para la estabilización de las antocianinas.

En el cual existe la posibilidad de adicionar crioprotectores adecuados a la bacteria concentrada después de la fermentación, después de lo cual el producto se debe de congelar para posteriormente ser liofilizado (*Lactobacillus casei* n.d.).

De acuerdo a lo reportado por Melina *et al.*, 2022 quienes utilizaron tres residuos agroindustriales de diferente naturaleza (Bagazo de sidra, Bagazo de cerveza y la combinación de estos dos residuos) a partir de los cuales el pH se ajustó a 7.0 Posteriormente a cada sistema se introdujo el probiótico con una suspensión inicial de $\sim 10^7$ UFC/ml, e incubado a 37°C bajo agitación suave (50 rpm) durante 24, 72 y 120 h. Transcurrido cada tiempo se procedió al recuento en placa de *L. casei* en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y a la determinación fisicoquímica de: hidratos de carbono (azúcares reductores por método de Fehling), polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu) y acidez total (expresada en g/L de ácido málico).

Al igual que el anterior, se realizó una experimentación similar con un sustrato diferente a los ya mencionados previamente, el cual fue reportado por Hurtado *et al.* (2021), del cual menciona que se realizó el estudio en base a las condiciones de supervivencia en estado de refrigeración utilizando jugo de pera como medio de cultivo en un lapso de 4 semanas en condiciones de refrigeración (4 °C). Del seguimiento de la supervivencia se realizó semanalmente mediante recuento en agar MRS luego de incubarse 48 h a 37 ± 1 °C. Del cual paralelamente se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, acidez y azúcares reductores en el jugo inoculado y sin inocular (control), en el tiempo cero en un tiempo establecido de 2 a 4 semanas.

A lo cual posterior a ello se realizó otra serie de pruebas utilizando como sustratos frutos y productos comestibles (Lactosuero, Fresa, Mango y Garcinia Madruno), reportado por Cravo and Crespo (2022), con el objetivo de tener un aumento en la obtención de biomasa para la generación de conocimiento sobre las formas de

crecimiento en los medios mencionados, los cuales poseen altos niveles de carbohidratos.

Tabla 2: Características físicas, químicas y microbiológicas de los sustratos para el cultivo de *L. Cassei* (*Garcinia Madruno*).

Parámetros	Lactosuero	Fresa	Mango	Garcinia madruno
<i>Acidez (%)</i>	1,09	0,82	0,15	19,07
<i>SST (Brix)</i>	6,65	5,5	7,4	7,9
<i>Cenizas (%)</i>	-	0,52	0,44	2,06
<i>Grasa (%)</i>	-	0,48	0,39	1,48
<i>Humedad (%)</i>	-	84,90	85, 44	89,40
<i>pH</i>	6,35	4,10	3,02	3,86
<i>Densidad (g/ml)</i>	1,03	-	-	-
<i>Proteína (%)</i>	0,91	0,72	0,78	6,66
<i>Nitrógeno Total (%)</i>	-	-	-	2,32
<i>Coliformes Totales (ufc)</i>	0	0	0	0
<i>Coliformes Fecales (ufc)</i>	0	0	0	0

Otro de los parámetros previamente estudiados ha sido el estudio de la producción de ácido láctico utilizando este mismo probiótico, la cual metaboliza la lactosa y produce dicho ácido como producto principal, de lo cual reporta Jimmy N.P. 2020. Donde relata que se realizaron múltiples corridas experimentales, del compuesto utilizando el programa estadístico Design Expert 11. Donde se determinó que las condiciones que permiten la maximización de la productividad volumétrica son 40.2 °C de temperatura y 5.6 de pH, alcanzando valores de 1.2 g/l·h.

2.3 Marco Teórico Conceptual

En esta sección se definirán algunos de los conceptos que se abordaron en el trabajo de investigación:

- Agroindustria

Es una de las áreas en el sector industrial que se encarga de la producción, manufactura y elaboración de productos de origen agrícola, forestal, ganadero o de alguna otra fuente natural biológica. Su objetivo, es la elaboración de productos comestibles para la alimentación humana o animal, incluyendo también productos destinados al sector farmacéutico, cosmético, etc. El cual a su vez se enfoca en las fases de procesamiento de los cuales abarcan desde la producción de insumos hasta la entrega del producto al consumidor (Ickis *et al.*, 2009).

- Residuos Agroindustriales

Son aquellos residuos que se generan a lo largo del proceso de manufactura de un producto ya sea de origen animal o vegetal, los cuales se caracterizan al ser de nulo interés para los pueden a llegar a ser un riesgo tanto para el medio ambiente como al ser humano al no manejarse adecuadamente bajo las medidas pertinentes, además de no poseer un valor comercial que los haga atractivos para su inversión ya sea por sus características fisicoquímicas o microbiológicas, siendo una de las principales causas por las cuales no se integran a los procesos industriales y en consecuencia no se tratan antes de su disposición final (Casas-Godoy *et al.*, 2014).

- Residuo Bovino

Se clasifica a los residuos provenientes del animal bovino, en donde se incluyen; estiércol, sangre, contenido ruminal, etc. residuos que llegan a ser contaminantes de alto impacto ambiental, por lo cual se requiere aplicarles un tratamiento adecuado, que permita obtener subproductos con alto valor agregado y con alto potencial de aprovechamiento para las diversas industrias que requieren las materias primas de origen animal.

- Foto Biorreactores

Dispositivos diseñados con la finalidad de cultivar agentes biológicos, en grandes volúmenes, en los cuales se deben considerar diferentes parámetros a controlar como pH, temperatura, niveles de intensidad lumínica, etc., mismos que son necesarios para el óptimo crecimiento de los microorganismos presentes.

- Lactobacillus

Los lactobacilos son bacilos o cocobacilos grampositivos, no formadores de esporas, con un contenido de G+C de ADN generalmente inferior al 50% molar. La cual comprende 261 especies las cuales poseen una gran diversidad en los niveles fenotípico, ecológico y genotípico.

Son bacterias estrictamente fermentativas, aerotolerantes o anaeróbicas, acidurias o acidófilas y tienen necesidades nutricionales complejas (por ejemplo, de hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas) (Zheng et al., 2020)

- Microalgas:

Las microalgas son organismos celulares las cuales poseen una gran diversidad de formas y tamaños, que se desarrollan en medios dulceacuícolas, así como en medios marinos de los cuales una gran parte de ellos se localizan en forma de plancton marino. Se estima que son los microorganismos que realizan el noventa por ciento de la fotosíntesis del planeta, considerándose como el primer eslabón de las cadenas alimentarias del ambiente acuático, de las cuales poseen una rica fuente de ácidos grasos polisaturados los cuales son fundamentales para el ser humano, como puede llegar a ser el ácido docosahexaenoico (DHA), etc. (Pensis, 2015).

- *Nannochloropsis Oculata*

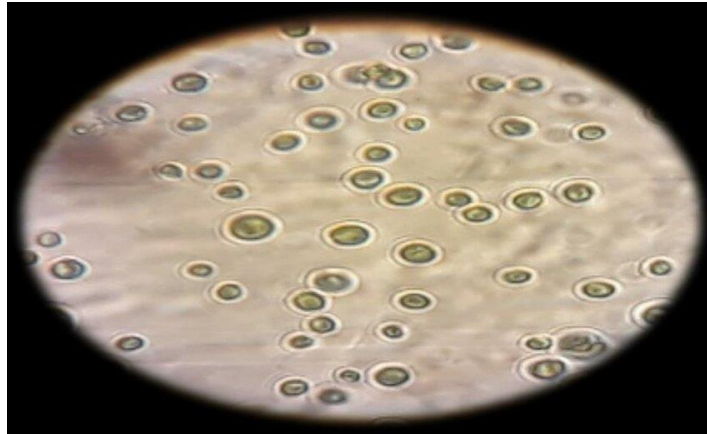


Ilustración 1: Microalga Nanocloropsis Oculata

Es una especie de microalga que se encuentra clasificada dentro del reino chromista, donde se incluyen las algas pardas pluricelulares, las diatomeas, algunos mohos, y las algas más grandes del mundo (Ávila & Cabrera 2015)

Las microalgas son un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos, entre las características que presentan, sobresale su capacidad para sintetizar diferentes compuestos orgánicos esenciales que sirven de alimento a los diferentes organismos consumidores a lo largo de la cadena trófica, entre estos compuestos destacan los Omega 3 ácidos grasos poliinsaturados (v.g. los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA)) así como diferentes pigmentos (v.g. clorofilas y carotenoides, entre otros).

González, O. G. M. (2014b).

.

- *Lactobacillus casei*

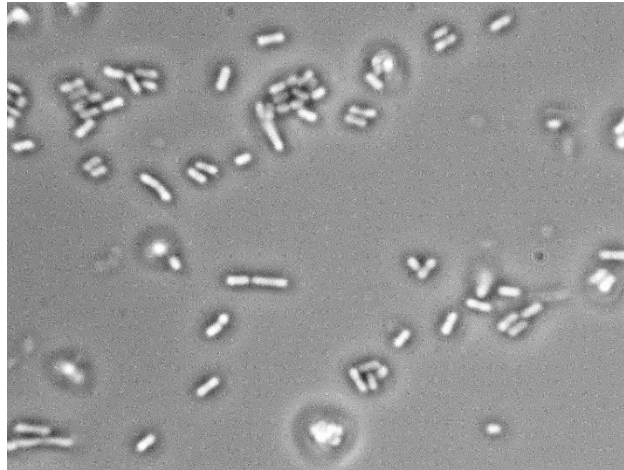


Ilustración 2 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei (*L. casei*) es una especie de lactobacilo que se encuentra en productos lácteos además de ser utilizado como probiótico. La cual produce ácido láctico en el tracto gastrointestinal donde se desempeña en romper alimentos, absorber nutrientes y combatir patógenos. Se encuentra en yogures, suplementos dietéticos y en algunos quesos (LACTICASEIBACILLUS CASEI: Overview, Uses, Side Effects, Precautions, Interactions, Dosing and Reviews, n.d.)

Es una bacteria tipo Gram positiva, el cual es un microorganismo anaeróbico habitante común en el intestino y en la cavidad bucal de humanos, es productora de ácido láctico, metabolito que se emplea en la industria láctea (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2009).

Del cual son facultativamente heteros fermentativos, del cual poseen un contenido de 45-47% molar de ADN G+C (Huang et al., 2018)

2.4 Marco Teórico

A partir de la época de la Revolución Industrial (1760 en el Siglo XVIII), la industria alimentaria ha estado presente en nuestras vidas, época en la cual, las grandes industrias iniciaron con su desarrollo tecnológico la creación e innovación de productos para el consumo de la sociedad, con procesos novedosos para aquella época, esto a su vez generó residuos a los cuales no se les dio la importancia que tienen hoy en día.

Al menos en México la agroindustria es una de las actividades económicas de mayor importancia a nivel nacional como internacional, de los cuales los productos más destacados son la cerveza, tequila, chocolate, cereales, etc. (De Agricultura y Desarrollo Rural, n.d.)

Con el paso del tiempo empezaron a surgir normativas nacionales e internacionales sobre el cuidado del medio ambiente, cuyo objetivo es regular la emisión de sustancias tóxicas al ambiente, así como el tratamiento previo a la deposición de residuos sólidos urbanos (RSU), de manejo especial (RME), etc.

Sin embargo, la generación de los residuos provenientes de la industria representa una problemática a nivel mundial, al no aplicar en su gran mayoría tratamientos adecuado para disminuir su impacto al ambiente, debido entre otros factores a la disponibilidad económica para el desarrollo de tecnologías más eficientes.

Uno de los mayores riesgos sin duda es la contaminación puntual que estos generan, lo que los convierten en contaminantes puntuales que puede causar daños colaterales en los ecosistemas circundantes que afectan tanto a la flora y fauna del área, además de convertirlos en vectores de enfermedades potenciales que pongan en riesgo la salud humana desencadenando enfermedades gastrointestinales, respiratorias, etc. (Adminmedix, 2018). Por lo cual es apremiante implementar procesos biotecnológicos viables desde el punto de vista económico como sustentable, que permitan el ahorro de energía a su vez que se enfocan en la optimización de los tiempos de operación, a lo por consecuencia en los costos de inversión, además de obtener subproductos con alto valor agregado, de tal manera que se aprovechen al máximo los recursos invertidos.

En la actualidad se han realizado diversos estudios especializados sobre la aplicación de procesos biotecnológicos autosustentables que favorezcan la economía circular (Obeid *et al.*, 2018).

El bagazo de cerveza o cebadilla (Brewer's spent grains en inglés) es un subproducto de la producción de cerveza, la cual se encuentra en forma de una pasta humedecida la cual es el resultado final de malteado, maceración y filtración obtenido posteriormente a la sacarificación de los granos de cereales utilizados para la elaboración de la cerveza. («El Bagazo de Cerveza o Cebadilla (Brewer's Spent Grains en inglés) Es un Subproducto de la Producción de Cerveza», 2021). Este residuo orgánico, que representa aproximadamente el 85% de los restos generados durante la producción de cerveza, tiene un contenido de materia seca del 20-25% y un contenido proteico del 24-26% sobre materia seca («Bagazo de cerveza: un subproducto con múltiples aplicaciones», 2019).

Se ha utilizado tradicionalmente como alimento para animales debido a sus cualidades nutritivas, pero en la actualidad se le da otros usos, como fertilizante orgánico, ingrediente en la construcción de cubiertas para azoteas, en la elaboración de papel, y como ingrediente en alimentos humanos como el pan. Además, se ha explorado su potencial para la elaboración de productos como barras de cereal y snacks. (*Bagazo De Cerveza Húmedo* | FEDNA, n.d.)

De esta resalta un área de oportunidad para un uso eficiente junto con la valorización del sustrato cervecero residual, con la finalidad de evitar un impacto a gran escala en la economía junto en el medio ambiental. (Castro-Criado *et al.*, 2023).

Por consecuente el aprovechamiento del residuo además de las aplicaciones mencionadas previamente, la cual se traduce en una gran mejoría en el sector económico, esto al darles un valor agregado que a su vez la cantidad de residuo generado disminuya considerablemente, lo que impulsa la creación de nuevas tecnologías denominadas “*Ecotecnologías*” las cuales se beneficiaran de estos residuos para minimizar el impacto en el ambiente.

Para ello el uso de digestores anaerobios es un medio adecuado para la degradación de los residuos para su biotransformación de materia prima residual a biomasa con valor agregado, especialmente para el uso de algunos microorganismos anaerobios como es el caso de microorganismos probióticos, quienes poseen una de las características de ser tolerantes al oxígeno, debido a que son capaces de activar vías alternas al metabolismo anaeróbico tradicional (Siciliano et al., 2019).

Los residuos ganaderos de origen bovino las cuales también se conocen como “*Estiércol*”, es uno de los elementos residuales más preocupantes en los agroecosistemas, a lo que concierne en un manejo inapropiado este puede llegar a ocasionar consecuencias en el ambiente, salud humana, el sector agroindustrial, etc. Del cual la existencia de agentes biológicos infecciosos como es la presencia de *Escherichia Coli*, *Salmonella*, Etc. Son de gran importancia ya que desencadenan enfermedades y sintomatologías de alto riesgo para la salud humana. (“Cómo Reutilizar Los Residuos Ganaderos Y Obtener Valor Agregado,” 2019).

Otra problemática puntual es la generación y emanación de olores indeseables junto con la producción de gases de efecto invernadero (Gas Metano, Dióxido de Carbono, Sulfuro de Hidrogeno, etc.), los cuales contaminan diversas áreas de interés humano (suelos para actividades agrícolas, mantos acuíferos, junto con la calidad de aire). Una de las practicas más comunes entre los ganaderos para el aprovechamiento del residuo de sus ganados es el uso del compostaje que varía de regiones demográficas, las cuales tienen la finalidad de generar fertilizantes para integrarlos a sus cultivos (“Cómo Reutilizar Los Residuos Ganaderos y Obtener Valor Agregado,” 2019).

Otra tecnología es el uso de la lombricomposta, el cual utiliza un agente biológico el cual es la Lombriz Roja Californiana (*Eisenia fetida*) o puede usarse como alternativa la lombriz Roja (*Lumbricus rubellus*). Una de sus mayores ventajas es la obtención de biofertilizantes ricos en nutrientes a la vez que pueden emplearse como mejoradores de suelo las cuales poseen poca disponibilidad de macronutrientes (Ruiz Morales, 2011).

Para ello se han empleado diversas tecnologías novedosas a gran escala para aprovechar estos residuos generados, una de ellas es el empleo de biodigestores, del cual se introduce dentro de un recipiente el cual se realizará una digestión anaerobia el cual va a degradar progresivamente el residuo lo que a su vez generan subproductos como lo es el biogás y abono (Ganadero, 2023).

El rendimiento en la producción de metano y/o la estabilidad de dicho tratamiento microbiológico pueden ser mejorados mediante la aplicación de diferentes pretratamientos ya sean físicos o químicos (Aplicación de tratamientos Térmicos, Adición de floculantes o coagulantes, Etc.), con la finalidad de ser tratado conjuntamente con múltiples sustratos de diversos orígenes el cual sería lo ideal, los cuales cuenten con la capacidad de ser biodegradables en un único sistema, el cual se debe al aumento de la biodiversidad en los digestores anaerobios, la dilución de inhibidores presentes en los sustratos y/o el aporte de nutrientes adicionales (Ángeles, 2015).

La aplicación de probióticos en la actualidad se ha vuelto esencial, principalmente en la industria alimenticia, por lo cual es importante destacar que el uso de *L. casei* en el tratamiento de residuos agroindustriales puede variar dependiendo de las condiciones específicas de cada caso y del tipo de residuos tratados. Además, es fundamental asegurar un adecuado manejo de control del proceso de tratamientos el cual se prioriza el maximizar los beneficios junto con la minimización de los posibles impactos negativos (Velásquez-Téllez, n.d.). De lo contrario puede no desarrollarse el microorganismo en cuestión alterando la composición química del sustrato, lo cual podría causar efectos negativos tanto para el sector medioambiental como en el sector económico.

Se ha evaluado el crecimiento poblacional de *L. casei* en diferentes sustratos, como suero clarificado, pulpa de uchuva, solución isotónica de glucosa y suero de leche de cabra, esto se debe a la presencia de nutrientes como carbohidratos, ácidos grasos, etc. Estos estudios han proporcionado información valiosa sobre la viabilidad y el crecimiento de esta bacteria en entornos específicos, lo que es fundamental para su aplicación en la producción de alimentos y productos biotecnológicos (Téllez et al., 2015).

Además, este probiótico se encuentra naturalmente dentro de la flora intestinal humana, la cual es de suma importancia en el sector salud, por esta misma razón el valor que se tienen de las biomasas generadas a partir del inóculo de *L. casei* son altamente apreciadas.

la aplicación de la biotecnología como es el caso de las microalgas para la depuración de aguas residuales y la recirculación de nutrientes al suelo. Las microalgas, como pueden ser las *Chlorella* y *Scenedesmus*, son eficientes en la eliminación de contaminantes y nutrientes de las aguas residuales. Además, contribuyen al desarrollo de sistemas de circuito cerrado mediante el reciclaje de nutrientes y la captación de carbono, de estas son opciones atractivas al tener un gran margen de beneficio tanto en el área económica como en la optimización de procesos.

Para ello se han empleado el uso de fotobiorreactores, los cuales son sistemas cerrados utilizados para el cultivo de microorganismos fotosintéticos, como las microalgas, en condiciones controladas. Estos dispositivos permiten el aprovechamiento eficiente de la luz solar y la optimización de otros parámetros ambientales para el crecimiento y la producción de biomasa de microorganismos beneficiosos (Petro energía, 2021). De estos existen diversos tipos, uno de ellos son los fotobiorreactores tipo balsa; de las cuales consisten en estanques de tamaño y forma adecuados que se llenan con medio de cultivo y se dejan crecer las microalgas. Este tipo de fotobiorreactor es económico y de bajo costo de operación, pero la productividad por unidad de superficie y la concentración de biomasa son bajas.

Fotobiorreactores tipo raceways, son fotobiorreactores abiertos que, además de proporcionar un medio adecuado para el crecimiento de las microalgas, también permiten la agitación y la mezcla, facilitando el intercambio de gases y el control del pH en cierta medida. Los previamente mencionados poseen un mayor nivel de eficiencia a diferencia de los estanques abiertos en términos de productividad y concentración de biomasa. (Ruiz Reyes, 2015).

Fotobiorreactores tipo tubulares: Esta clase de fotobiorreactores consiste en tubos o tuberías transparentes en forma de bucle o serpentín, a través de los cuales

fluye el medio de cultivo y las microalgas. Donde la luz solar incide directamente sobre los tubos, permitiendo una mayor eficiencia en la captación de energía luminosa. Los tipos tubulares llegan a tener un gran repertorio junto con una disponibilidad de opciones dentro de sus configuraciones, como lo son los tubos horizontales, verticales o inclinados, los cuales se adaptarán dependiendo del entorno donde se montarán (Biotecnológico, 2021).

De estos se tiene múltiples beneficios a la hora de emplearse los cuales permiten un desarrollo óptimo de la microalga a desarrollar, además de permitir un control preciso de los parámetros ambientales, como la intensidad lumínica, la temperatura del medio, el pH y la concentración de nutrientes presentes. Lo cual garantiza las condiciones óptimas para el crecimiento y la productividad de los microorganismos beneficiosos (Benavente-Valdés et al., 2012).

Cabe recalcar que, de las principales aplicaciones de esta tecnología, son usados principalmente en el tratamiento de aguas residuales agroindustriales, donde las microalgas desarrollan la capacidad de absorber y metabolizar los nutrientes presentes en el agua, reduciendo la carga contaminante que a su vez produce una biomasa de valor agregado. A su vez también pueden ser utilizados como una fuente de combustible, ya sea desde la producción de biogases, hasta la generación de las propias biomásas, siendo estas un producto de alto valor por lo cual se reporta que las empresas dedicadas a la generación de combustibles, reportan que el uso de las microalgas para la generación de biocombustibles es un 30% mas eficiente a diferencia de oleaginosas terrestres, las cuales dentro de su naturaleza, el 50% son lipídicas lo que representa la mitad de su peso (González-Lazo, 2019).

Además de contar con una protección contra contaminantes externos: Al ser sistemas cerrados, los fotobiorreactores protegen a las microalgas que son beneficiosos de la contaminación externa, lo que garantiza la pureza y la calidad de la biomasa producida. su rendimiento no será comprometido bajo ninguna circunstancia (*Fotobiorreactores SCHOTT*. (s. f.)

Cabe mencionar que el cultivo de estas a diferencia de otros agentes biológicos, no se requiere el uso de suelos para su cultivo, debido a que la naturaleza de

estas requiere de medios acuáticos, ya sean de origen salino (Provenientes de los océanos), o de aguas dulces (Provenientes de lagos, ríos, etc.).

Para el desarrollo e interpretación de los datos generados, se utiliza el modelo matemático de curva de gumpertz el cual es un tipo de modelo matemático utilizado para describir el crecimiento de una serie temporal (Parés-Casanova, n.d.).

La curva de Gompertz es una función sigmoidea que describe el crecimiento como más lento al comienzo y al final de un período de tiempo dado. La curva tiene una asíntota hacia la derecha, donde el valor futuro de la función se aproxima de manera más gradual, en contraste con la asíntota hacia la izquierda, donde el valor inferior se acerca simétricamente a la curva. Esta función es un caso especial de la función logística generalizada (Casas, n.d.).

Para realizar la modelación de la curva, es necesaria contar con una base de datos de las cuales se dividen en cuatro elementos esenciales:

Datos de tiempo: En este punto se requiere una serie temporal que represente el período de tiempo en el que se observa el crecimiento del objeto de estudio de interés. Esto puede ser en días, meses, años u otra unidad de tiempo determinada según el tiempo marcado por el estudio a desarrollar.

Datos de crecimiento: Se necesitan datos que representen el crecimiento observado en el período de tiempo especificado. Estos datos pueden ser en forma de números absolutos o porcentajes de crecimiento dependiendo de la unidad de medida empleada.

Puntos de inflexión: La curva de Gompertz tiene puntos de inflexión que indican el cambio en la tasa de crecimiento (fase Log, fase Lag, fase estacionaria, fase de muerte). Se requiere de esta clase de datos que identifiquen dichos puntos de inflexión en la serie temporal.

Parámetros de ajuste: La curva de Gompertz se ajusta utilizando parámetros específicos que determinan la forma y el ajuste de la curva a los datos observados (Tiempo, recursos utilizados, . Estos parámetros incluyen el punto de inflexión, la tasa de crecimiento máxima y otros parámetros relacionados (Dietrichson, n.d.).

CAPITULO III: METODOLOGIA

En el caso de estudio se utilizaron métodos aprobados por la federación los cuales han sido abalados e introducidos dentro de las metodologías estandarizadas dentro de las normativas oficiales mexicanas, junto con sus iguales.

Tabla 3: Métodos de análisis empleados.

Parámetros:	Método
<i>pH</i>	2320-B de la APHA-AWWA-WPFC (1991)
<i>ST</i>	2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999).
<i>STV</i>	2540G de la APHA-AWWA-WPFC (1999).
<i>Fosforo</i>	Método 4500-PB 4.
<i>Carbohidratos</i>	Método de la antrona modificado (1973).
<i>Nitrógeno</i>	Método Kjeldahl
<i>D.Q.O.</i>	Micro método (técnica colorimétrica)
<i>D.Q.O. Soluble</i>	Micro método (técnica colorimétrica)
<i>Coliformes Fecales</i>	(NOM004-SEMARNAT-2002)

potencial de Hidrogeno (pH), Solidos Totales (ST), Solidos Totales Volátiles (STV) Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O), Demanda Química de Oxígeno Soluble (D.Q.O. Soluble)

3.1 Acondicionamiento de la muestra

El sustrato obtenido se le realizo una dilución 1:6 del cual se peso 15gms de la muestra en estado sólido, del cual se adiciono 750ml de agua destilada, posterior a ello con el uso de un colador se filtró hasta obtener la mayor cantidad de muestra en esto líquido, a lo cual se depositó en un recipiente herméticamente cerrado para sus posteriores análisis.

3.2 Organismos

Se utilizaron los microorganismos *Nanocloropsis Oculata*, la cual es utilizada para procesos de acuicultura y microbiología algal, la cual posee una suspensión celular de 100ml. La microalga que se cultivó en medio líquido F/2 del cual

requiere poseer un pH de 6.8 a su vez deberá poseer una iluminación de >100 $\mu\text{E}/\text{M}/\text{s}$.

Parte de sus características es que posee un diámetro de μm – 5 μm . Pigmentos principales clorofila a y violaxantina. Junto con una pared celular Rígida, compleja; algagenanos, celulosa, glicoproteínas, pectinas, carragenanos (*Hoja Técnica Nannochloropsis Oculata*, 18d. C.)

El *Lactobacillus casei* se cultivó en medio MRS (DeMan, Rogosa &Sharp) en tubos de ensaye de 10 ml, a partir de este cultivo se llevó a cabo el desarrollo de las cinéticas de crecimiento, a una temperatura media de 37°C, el cual su primer conteo celular tuvo una relación 6/10.

3.3 Parámetros Físicos: Solidos Totales

Los sólidos totales se denominan como la materia orgánica residual posterior al proceso de evaporación junto con el secado de la muestra con una temperatura ya establecida. La muestra se evapora en un crisol de porcelana a peso constante, a temperatura de 103°-105°C en un periodo de 24 horas, el aumento del peso sobre el peso del crisol vacío, representa el peso de los sólidos totales.

Calculo

$$\%ST = \frac{P_3 - P_1}{P_2} * 100$$

Ecuación 1: cálculo de sólidos totales

Dónde:

P₁= Peso del crisol a peso constante.

P₂= Peso de la muestra.

P₃=Peso del crisol a peso constante + muestra seca.

3.4 Parámetros Físicos: Solidos Totales Volátiles

Una vez que se haya producido el residuo generado en la determinación de la técnica de Solidos Totales el cual se han mencionado anteriormente, se introduce en una mufla y se calcina la muestra hasta alcanzar los 550°C en un lapso de dos horas, el peso que perdió el crisol tras la calcinación del residuo seco representa el contenido de los sólidos volátiles, al igual que la anterior determinación.

Calculo

$$\%SV = \frac{P_3 - P_4}{P_3 - P_1} * 100$$

Ecuación 2: Cálculo de sólidos totales volátiles

Dónde:

P₁= Peso del crisol a peso constante

P₂=Peso de la muestra

P₃= Peso del crisol a peso constante + muestra seca

P₄= Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada

3.5 Parámetros Físicos: pH

El pH es uno de los parámetros que marca la concentración de los iones de Hidrogeno en una disolución existente, para ello se utiliza un equipo (Potenciómetro de mesa pH/mV MESA SM-25CW) donde se introduce directamente el electrodo en la muestra el cual en la pantalla del equipo nos arroja la lectura de la medición de la muestra de interés.

3.6 Parámetros Químicos: Determinación de Carbohidratos por el Método de Antrona – Sulfúrico

La determinación de carbohidratos se determinó mediante el método de Antrona (H_2SO_4), el cual rompe los enlaces glucosídicos de los carbohidratos presentes en el sustrato. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 94°C en un lapso de 12 minutos, posteriormente una vez que los tubos tomaron una coloración azul oscuro, las muestras se dejaron a temperatura ambiente, antes de leer en el espectrofotómetro a una de absorbancia de 620 nm

3.6.1 Metodología para la preparación del reactivo Acido - Antrona

Para la ejecución de la técnica de Carbohidratos Método Acido Antrona, en un tubo con rosca se miden 0.02ml de la muestra a analizar, se adiciona 2ml de la solución Ácido sulfúrico para que se lleve a cabo la reacción, una vez adicionados aparecerá una turbidez de color blanco lo cual se debe de mezclar homogéneamente para que la reacción se desarrolle debidamente, a lo consiguiente se deberá calentar en baño tipo maría los tubos con las muestras a analizar las cuales deberán alcanzar una temperatura de 94°C en un intervalo de 12 minutos, tras ello la muestra tomara una coloración azul oscuro a lo que por consecuente se deberá dejar de enfriar en un tiempo aproximado de 10min, una vez los tubos sean manipulables se procederán a leer en el espectrofotómetro con una absorbancia de 620nm.

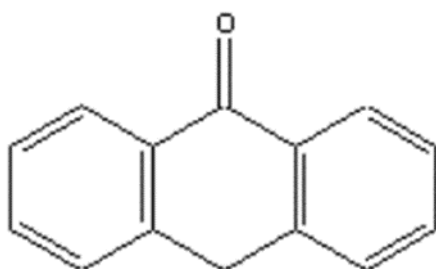


Ilustración 3: Estructura química del compuesto Antrona

3.7 Determinación de Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O.) Por Micro-Método (Técnica Colorimetría)

La demanda química de oxígeno se emplea como una de las técnicas de medición del Oxígeno el cual equivale a la materia orgánica contenida la cual es susceptible a oxidación por un oxidante químico orgánico lo cual se debe a la presencia de los agentes microbianos presentes en el medio.

Previamente al desarrollo de la técnica, se realizó la dilución (1:4) a la muestra de interés, se tomarán 2 ml de muestra y se diluyó en 6ml de agua destilada, a partir de esta muestra se midieron 10 ml y la muestra se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos.

Posteriormente se mezcló 1 ml de las muestras a analizar con 0.5 ml de la solución digestora y la solución de ácido sulfúrico puro con sulfato de plata. La mezcla se homogenizó mediante agitación, lo cual genera una reacción exotérmica.

La placa digestora se calentó previamente a una temperatura de 150°C, una vez alcanzada la temperatura deseada, se procedió a distribuir equitativamente los tubos con rosca en la placa de digestión, para ello se dejaron en reposo por un periodo de dos horas. Una vez concluido el tiempo de digestión, se dejó enfriar en un área ausente de fuentes lumínicas por un lapso de 10 minutos, posterior a ello las muestras se midieron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 620nm.

3.8 Determinación de Nitrógeno Total Kjeldahl (Proteínas)

El método Kjendal se basa en la combustión húmeda de las muestras, para lo cual se usaron los siguientes reactivos para llevar a cabo la digestión; Sulfato de Cobre (CuSO_4), Sulfato de Potasio (K_2SO_4), Selenio (Se), Ácido Sulfúrico Concentrado (H_2SO_4), Ácido Bórico al 4% (H_3BO_3), Hidróxido de Sodio al 40% (NaOH).

Se pesaron de 30 a 50 miligramos de muestra de la cual se depositaron en matraces microkjendhal (Matraces de Digestión), se adicionaron 0.2 gramos de sulfato de cobre (CuSO_4), 0.5 gramos de Sulfato de Potasio (K_2SO_4), 0.1grms de selenio (Se) y finalmente se agregaron 3ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), agitando suavemente a lo cual se agita suavemente para que obtener una mezcla homogénea.

En consecuente a ello se llevaron a digestión a la parrilla digestora la cual se tendrá un tiempo estimado de 1 hora (aproximadamente) para que la muestra tome una coloración de color verde lima (o en su caso una tonalidad más clara).

En vasos de precipitado de plástico de 50ml, se agregaron 10ml de Ácido Bórico al 4% y a cada uno de ellos se adiciono una gota de rojo de metilo.

Se dejará enfriar los matraces kjendal y durante este intervalo, se adicionará agua destilada hasta llegar al nivel suficiente, posterior a ello se calentará el Destilador microkjendhal hasta llegar a su punto de ebullición del agua.

Posterior a ello se vierte la muestra en el destilador y se captará en los vasos de precipitado de plástico con la solución de Ácido Bórico al 4% la cual se encontrará en un baño de hielo.

El destilado recolectado se capta en la solución de Ácido Bórico al 4%, el cual se encontrará a los 10ml, al momento de captarse el destilado aumentará el volumen de este hasta los 25ml, el cual cambiará su coloración de morado a verde claro, posterior a ello se titulará con Ácido sulfúrico 0.02N, el cual cambiará la coloración de verde a rosa, el cual se deberá registrar los mililitros gastados de la titulación.

Calculo:

$$\%N = \frac{G * N * 0.14}{M} * 100$$

Dónde:

G=mililitros de la solución gastados en la titulación.

N= normalidad de la solución usada en la titulación.

0.014= mili equivalentes de nitrógeno.

M= peso de la muestra en gramos o volumen en mililitros.

Para convertir el nitrógeno a proteína, los valores obtenidos de % de nitrógeno se multiplican por los factores publicados de los alimentos.

Posterior a ello se calculará el porcentaje de proteína total a partir del contenido de nitrógeno, se usa el factor que varía según el origen de la muestra el cual se aplica la siguiente ecuación:

Calculo:

$$\%P = \%N \times F$$

%P=Porcentaje de proteína

%N=Porcentaje de nitrógeno

F=factor de conversión

3.9 Determinación de Fosforo (Método 4500-PB 4. Digestión con Ácido Sulfúrico-Ácido Nítrico)

Para el desarrollo de la técnica en primera estancia, el material se deberá lavar previamente con ácido clorhídrico y con agua destilada lo cual ayudará a eliminar cualquier rastro de fosforo en el material así evitando la aparición de falsos positivos.

Previamente la muestra será centrifugada por cinco minutos a 5,000 rpm, de la cual se trabajará únicamente con la fase líquida obtenida de la muestra.

Una vez concretado los anteriores pasos, se medirá en un matraz microkjeldhal 5ml de la muestra que se centrifugo previamente, a lo cual se le adicionará 0.5ml de Ácido Sulfúrico Concentrado (H_2SO_4), además de adicionar 2.5ml de Ácido Nítrico (HNO_3). Posterior a ello se llevará a digestión en el digestor micro-Kjeldahl las muestras hasta la obtención de 1ml del total de la muestra.

Concluida la digestión se dejará enfriar hasta poder ser manipulable, prosiguiendo con la adición de 10ml de agua destilada y a su vez agregar 0.05ml de indicador de fenolftaleína (una gota aproximadamente).

Se añadirá una cantidad requerida (20ml aproximadamente) de solución de NaOH 1N lo cual producirá una ligera coloración rosa en la muestra.

A continuación, se transferirá la muestra a un matraz aforado de 50ml, prosiguiendo a aforar hasta alcanzar los 50ml utilizando agua destilada.

Se tomarán 25ml de la muestra de lo cual se auxiliará con una pipeta de 25ml, de la cual se transferirá a un matraz Erlenmeyer de 125ml, también se le adicionará 0.05ml de indicador de Fenolftaleína (una gota aproximadamente).

Añadirá 4ml de reactivo combinado a lo cual se deberá mezclar de forma homogénea, dentro de un lapso de diez minutos se dejará reposar lo cual cambiará su tonalidad de color rosa a una coloración azul.

Finalmente se medirá su absorbancia en el espectrofotómetro a 880nm, con un blanco de referencia.

Cálculos:

$$mgP/l \frac{mgP \text{ (en vol. final de 58 ml aprox.)} \times 1000}{ml \text{ muestra}}$$

3.10 Parámetros biológicos: Determinación de coliformes fecales (NOM004-SEMARNAT-2002)

Para el acondicionamiento de la muestra se deberá de suspender una cantidad X g de la materia a determinar la cual deberá corresponder a 4g de sólidos totales en 36ml de agua de disolución para así obtener una dilución de 10⁻¹, la cual deberá mezclarse en un lapso de 2 a 3 minutos, auxiliándose con una parrilla de agitación a una velocidad de 800rpm.

Posterior a ello se deberán de preparar diluciones decimales, la cual se deberá de transferir 1ml en 9ml de agua de dilución de forma sucesiva hasta la obtención de la dilución requerida, las cuales deberán ser agitadas energéticamente 25 veces en 7 segundos, con la finalidad de obtener resultados comparables.

Se requerirá el uso de diferentes pipetas las cuales previamente deberán ser esterilizadas para ser usadas en cada una de las diluciones decimales, para el aforo de la pipeta se deberá introducir la punta de esta en el interior del cuello del tubo de ensaye manteniendo una posición vertical, inclinando el tubo, por lo que se debe evitar introducir más de la tercera parte de la pipeta.

En el caso de realizarse por primera vez el análisis a una muestra se deberá utilizar al menos cuatro series de tres o cinco tubos de cada una, para posterior utilizar tres series de tubos.

Para la realización de la prueba presuntiva se deberá transferir 1ml de las diluciones previamente seleccionadas a cada una de las series de tubos correspondientes las cuales deberán de contener caldo lactosado y ser incubados a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Los tubos deberán ser examinados a las 24 horas de su incubación, la cual se acidificar el medio con o sin producción de gas la cual se indica con un cambio de coloración de púrpura a color amarillo, a partir de este punto indica una prueba presuntiva positiva de la presencia de coliformes fecales, en caso contrario incubar un segundo lapso de 24 horas.

La acidificación del medio, con o sin formación de gas en el lapso de las 48 ± 3 horas, finaliza con una prueba presuntiva positiva, en caso contrario concluye la prueba.

Se seleccionarán los tubos de la prueba presuntiva que hayan dado positivos, se reseman por triple asada (previamente esterilizada con el uso de un mechero), en tubos de fermentación los cuales contendrán el caldo EC, posterior a ello serán incubados a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en un lapso de 24 ± 2 horas.

Finalmente, los tubos que presenten una producción de gas en el medio, serán considerados positivos en la prueba confirmativa, los tubos sin esta formación, serán desechados.

Cálculo

$$\text{NMP} = (\text{NMP de tablas}) \times (10/\text{mayor volumen inoculado}) \quad (1)$$

3.10.1 Preparación de caldo lactosado con púrpura de bromocresol

Se realiza la preparación del medio C.L. la cual se encuentra deshidratada, para a ello se empleará una parrilla de agitación para la mezcla de los compuestos a su vez se pesará una cantidad de 0,01g de púrpura de bromocresol, las cuales se adicionarán en 1lt de agua destilada, por lo que deberá poseer un pH de $6,9 \pm 0,2$, en caso contrario se deberá ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0,1N. Finalmente se distribuirá en volúmenes de 10ml del medio preparado en tubos de ensaye, los cuales se deberán tapar, sellar y esterilizar en la autoclave a 121°C en un lapso de 15 minutos.

3.10.2 Preparación del medio EC

Se disolverá el medio EC el cual se encuentra en forma deshidratada, auxiliándose con una parrilla de agitación, la cual se disolverá en 1lt de agua destilada, la cual deberá poseer un pH de $6,9 \pm 0,2$ en caso contrario se deberá ajustar con una solución de hidróxido de sodio 0,1N, posteriormente se distribuirá en volúmenes de 10ml en tubos de ensaye los cuales deberá poseer en su interior tubos de Durham invertidos, los cuales se deberán tapar y esterilizar en la autoclave a 121°C en un lapso de 15ml.

3.10.3 Solución tampón A

Disolver fosfato monopotásico en 500ml de agua destilada, la cual deberá poseer un pH de $7,2 \pm 0,2$ con la solución de hidróxido de sodio 1 N y aforar a 1 L de agua destilada, la cual se esterilizará en la autoclave a 121°C por 15 minutos

3.10.4 Solución tampón B

Disolver cloruro de sodio magnesio en 500ml de agua destilada y aforar a 1000ml con agua destilada, posterior a ello se esterilizará en la autoclave a 121°C en un lapso de 15 minutos.

3.10.5 Agua de dilución

Se adiciona 1,25ml de la solución tampón A y 5ml de la solución tampón B, las cuales se deberá aforar a 1L con agua destilada, posterior a ello se distribuirá en tubos de rosca con cierre hermético, para finalmente esterilizar en la autoclave a 121°C en un lapso de 15 minutos.

3.11 Conteo Celular

Se realizó una dilución 1:10 (1 ml de muestra biológica y 9ml de agua destilada) la cual se utilizó un microscopio con los objetivos 100X y 40X, para realizar el conteo se utilizó la cámara de Neubauer junto con un contador de células manual.

Para el *Lactobacillus Cassei*, se utilizó el objetivo 100X junto con el uso de aceite de inmersión (una gota) para la cuantificación celular, en el caso de la microalga *Nanocloropsis Oculata* se utilizó el objetivo 40X, en ambos casos se requirió el uso de un cubre objetos.

3.12 Inoculación de *Lactobacillus Cassei*

Tabla 4: Caracterización fisicoquímica del residuo cervecero artesanal.

Parámetro	Unidad	Residuo BSG
<i>Sólidos totales</i>	%m/m	91.43
<i>Sólidos totales volátiles</i>	% m/m	84.87
<i>Carbohidratos</i>	g/L	14.801
<i>Proteínas*</i>	%	11.29
<i>Nitrógeno*</i>	mg/kg ST	1.80
<i>pH</i>	----	5

Se prepara el caldo MRS para los mililitros que se deseen preparar (Nota: adicionar 10ml más de lo requerido), adicionar en los tubos de ensaye a esterilizar junto con el caldo MRS en el auto calve a una temperatura de 121°C en un lapso de 15 minutos.

Una vez terminado el tiempo de esterilización, se dejará enfriar los materiales y reactivos hasta poder ser manipulables, por consecuente se esterilizará el área donde se realizará la propagación del inoculo.

Se agregarán 9 ml del caldo MRS a los tubos junto con 1ml del inoculo para completar los 10 ml totales. Posterior a ello se sellarán los tubos a los cuales se incubarán a la estufa de cultivo por 24 horas a una temperatura de 37°C, se deberá revisar que se haya formado un precipitado de coloración Blanca lo cual nos indicara que se desarrolló el agente microbiano a lo que finalmente se almacenarán en el refrigerador para su posterior uso.

3.13 Desarrollo de las cinéticas de bioconversión Anaerobia con el uso de Probióticos

Con la finalidad de evaluar los rendimientos en diversas concentraciones del probiótico utilizado, del cual en primera instancia se utilizaron tres matraces Erlenmeyer de 250 ml, a cada uno de estos se les adiciono diversas cantidades de agua destilada (M1: 190 ml, M2: 180 ml, M3: 170 ml), posterior a ello se esterilizaron en la autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos, posterior a ello se pesaron en diversas cantidades el sustrato (M1: 15.2018, M2: 14.4015, M3: 13.6017) a los cuales se adicionaron en los matraces con agua destilada en su interior que previamente se esterilizaron. En consecuente se adiciono el inculo a utilizar (*L. casei*) en los matraces a utilizar en diversas concentraciones (5%, 10%, 15%).

Finalmente se recubrieron la parte superior de los matraces con papel aluminio para realizar el proceso de fermentación anaerobia, donde únicamente se introdujo una manguera de plástico de un diámetro de ¼", con la finalidad de tener un medio adecuado para la toma de la muestra en cuestión. Para llevar a cabo el proceso fermentativo anaerobio, se utilizó el equipo de agitador universal a una temperatura constante de 32°C, de las cuales se distribuyeron de forma equitativa, a lo cual durante el proceso se realiza la toma de la muestra cada 4 horas, con la finalidad de tener un monitoreo y evaluación de rendimiento del probiótico utilizado en un tiempo establecido de 72 horas, ya que es el tiempo esperado para el desarrollo completo del probiótico en la muestra de interés

3.14 Desarrollo de las cinéticas de Bioconversión Aerobia con el uso de Microalgas

Los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica del residuo bovino se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del residuo bovino.

PARAMETRO	UNIDAD	PROMEDIO
<i>ST</i>	%m/m	1.28
<i>STV</i>	%m/m	67.39
<i>pH</i>	----	9.62
<i>DQO mg/L</i>	Mg/L	1966.30
<i>DQO Soluble mg/L</i>	mg/L	792.80
<i>Fosforo Total</i>	164.06	164.06
<i>Coliformes Fecales</i>	NMP	500x10 ⁴

Se preparó una dilución 1:6; para lo cual se tomaron 900 ml de muestra total (150 gramos de muestra) y se agregaron 750ml de agua destilada.

Posteriormente se Filtró en un colador de metal de 30 cm de diámetro hasta la obtención de residuo en estado líquido. Se prepararon seis biorreactores tipo Batch, ubicados en área estéril a cada uno de los cuales se le adicionó un volumen de inóculo a diferentes concentraciones (15%, 30%, 45%), finalmente se adicionó el sustrato en diversas cantidades (340 ml, 280 ml, 220 ml). Con la finalidad de promover la fotosíntesis, se utilizó iluminación tipo led de luz blanca con una intensidad de 3,000 lux en un periodo establecido de 12 horas, posteriormente un segundo periodo de 12 horas de oscuridad para obtener un óptimo crecimiento.

Con la finalidad de que la microalga empleada se adapte y a su vez se desarrolle en el medio, para ello se realizó en sistema aislado (sin entradas ni salidas) en un lapso de 21 días para concluir si consigue adaptarse en el medio a trabajar, de la cual se deseó obtener biomásas obtenidas de la microalga esto con la finalidad de analizarlas para su posterior investigación en el uso y aplicación tecnológica.

3.15 Determinación de Biomasa micro algal

La biomasa obtenida posterior a los 21 días de su cinética, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos con la finalidad de separar la fase líquida de la fase sólida.

Una vez centrifugada la muestra, la fase sólida la cual previamente se centrifugó en agua destilada, con la finalidad de remover la mayor cantidad de residuos sólidos (se repitió esta operación dos veces).

Prosiguiendo con la metodología, se depositó la fase sólida en crisoles de porcelana las cuales se encontraban a peso constante, en horno de secado por un lapso de 4 horas a una temperatura de 95°C.

Se registró el peso de los crisoles (p1), El peso de la muestra centrifugada (p2) y el peso de la muestra posterior a las 4 horas de secado (p3).

Posterior a ello se encontrará, la muestra lista para proseguir con las determinaciones correspondientes.

3.16 Determinación de Biomasa probiótica

Una vez finalizado el proceso fermentativo anaerobio, se procedió a captar la biomasa generada de los matraces empleados.

Para ello se agitaron energéticamente los matraces, debido a que la muestra en cuestión se sedimentó en gran parte. Posterior a ello se vierte la muestra en tubos de centrifugado con rosca los cuales poseen una capacidad máxima de 50 ml, se vierten hasta que todos los tubos tengan el mismo nivel de muestra en su interior.

Continuando con la metodología, se cierran los tubos para introducirlos a la centrifuga, la cual esta operación se realizará en un lapso de 5 minutos a 5,000 revoluciones por minuto.

Posterior a este paso se separará la fase líquida de la fase sólida, para ello se requerirá el uso de capsulas de porcelana donde se registrará el peso de estas (p1), se depositará la fase sólida previamente centrifugada en las capsulas las cuales se registrarán su peso (p2), finalmente se introducirán a la estufa de secado la cual tendrá una temperatura constante de 95°C en un lapso de 24hrs.

Finalmente, pasadas las 24hrs, los crisoles se depositarán en un desecador por 10min, una vez la temperatura de estos haya disminuido, se registrará el peso de estas (p3). A lo cual se procederá a la pulverización de la biomasa utilizando un mortero y pistilo, finalmente se depositará en un lugar seco a su vez libre de humedad, la cual se encontrará lista para sus futuras determinaciones.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Tratamiento del residuo a partir del probiótico *Lactobacillus casei*

El sustrato se obtuvo de una microempresa localizada en la ciudad de Orizaba, Veracruz, el cual obtuvo en estado sólido (partículas finas), del cual se realizó el análisis de los parámetros de interés (físicos-químicos), de los resultados analizados de los parámetros físicos, se muestra que el pH del sustrato es ácido (pH 5), a su vez se muestra un alto porcentaje en los ST junto con los STV, mientras que en las determinaciones químicas se tuvieron concentraciones considerablemente elevadas de carbohidratos y de proteínas dentro del mismo, a comparación del Nitrógeno el cual fue relativamente más bajo a comparación de los otros dos elementos.

En el desarrollo de la cinética anaerobia se optó por el uso de tres concentraciones diferentes del sustrato junto con el agente microbiológico (*Lactobacillus Cassei*), esto con la finalidad de evaluar el rendimiento del probiótico en las diversas concentraciones del sustrato.

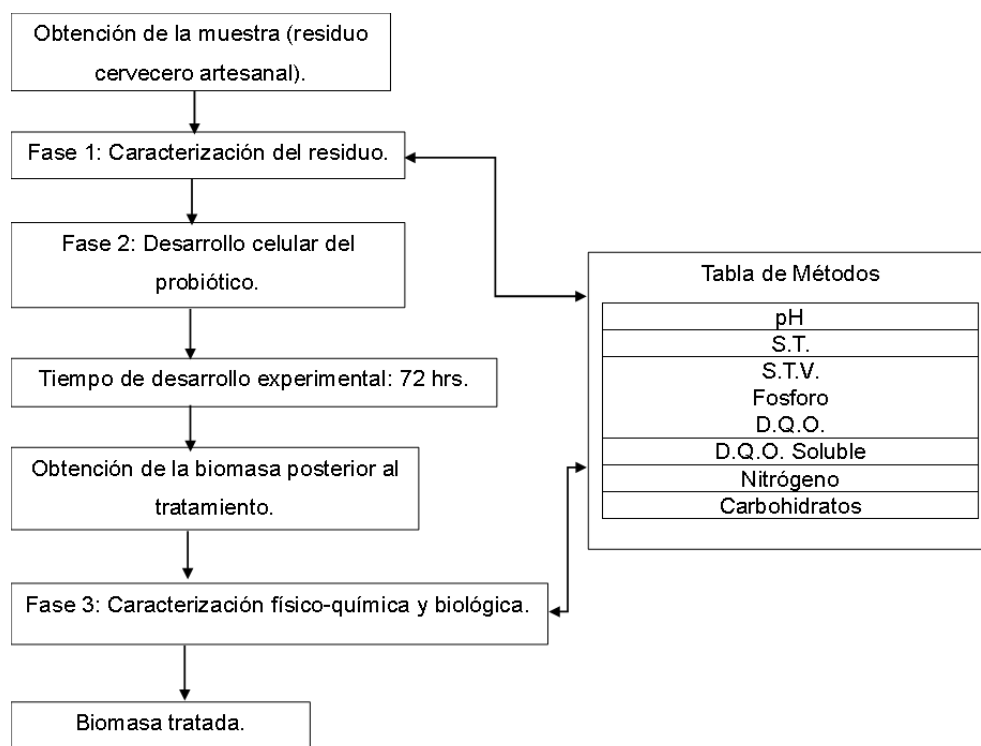


Ilustración 4: Diagrama del desarrollo experimental del *Lactobacillus Cassei*.

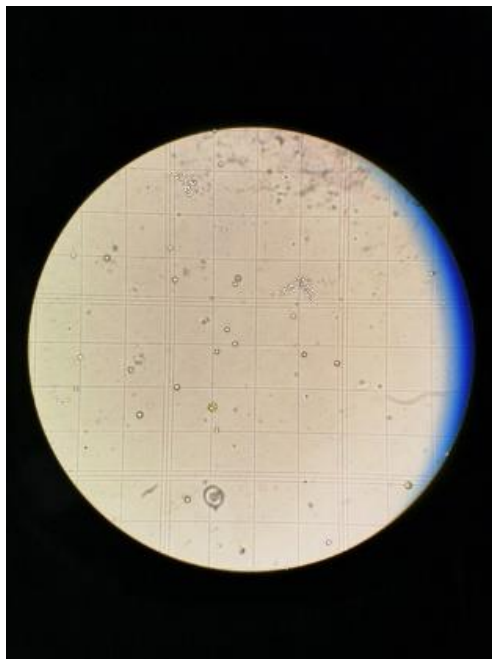


Ilustración 5: Conteo del Lactobacilo utilizando la cámara de Neubauer Utilizando el objetivo 100x complementado con aceite de inmersión.

Posterior a la determinación de Carbohidratos, Proteínas y Nitrógeno se muestra una concentración media en los niveles de carbohidratos, a diferencia de la determinación de los otros dos parámetros, los cuales se obtuvieron niveles relativamente bajos.

El crecimiento del Probiótico empleado (*L. casei*) en el residuo cervecero artesanal empleado en lapso establecido de 72 horas, se generaron las curvas de crecimiento en sus diversas concentraciones del inoculo (5%, 10%, 15%).



Ilustración 6: Desarrollo de la cinética anaerobia del lactobacilo L. Cassei en sus diversas concentraciones (5%, 10% y 15%) utilizando un agitador orbital

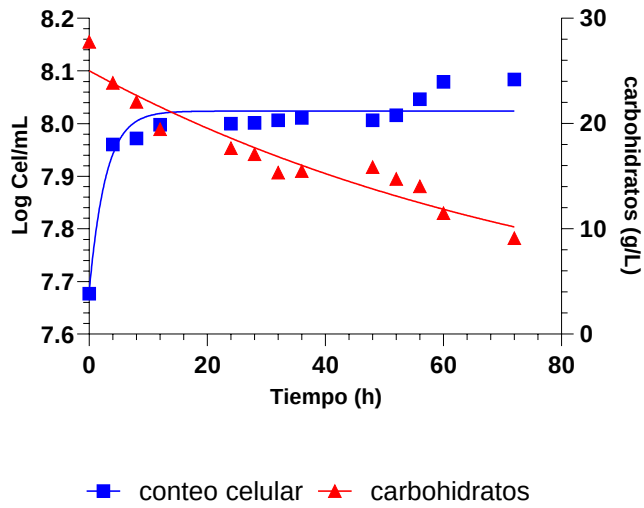
De las cuales se obtuvieron crecimientos poblacionales significativos, junto con un notorio consumo de carbohidratos.



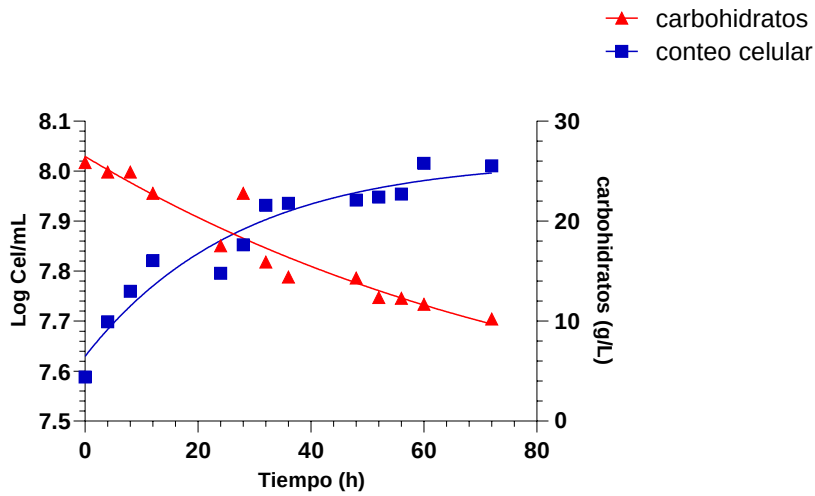
Ilustración 7: Digestión de muestras utilizando el método de Baño María para la determinación de carbohidratos

Se observó que la cinética fermentativa anaerobia con la menor concentración fue el que se obtuvieron valores de crecimiento poblacional elevado, esto se debe a la disponibilidad de carbohidratos presente en el medio lo cual le favoreció en gran medida para la disminución de este recurso y la generación de una biomasa rica en nitrógeno y proteínas, de lo cual se desarrolló en un intervalo de tiempo relativamente corto, de la cual se mantuvo una temperatura continua de 32°C, a

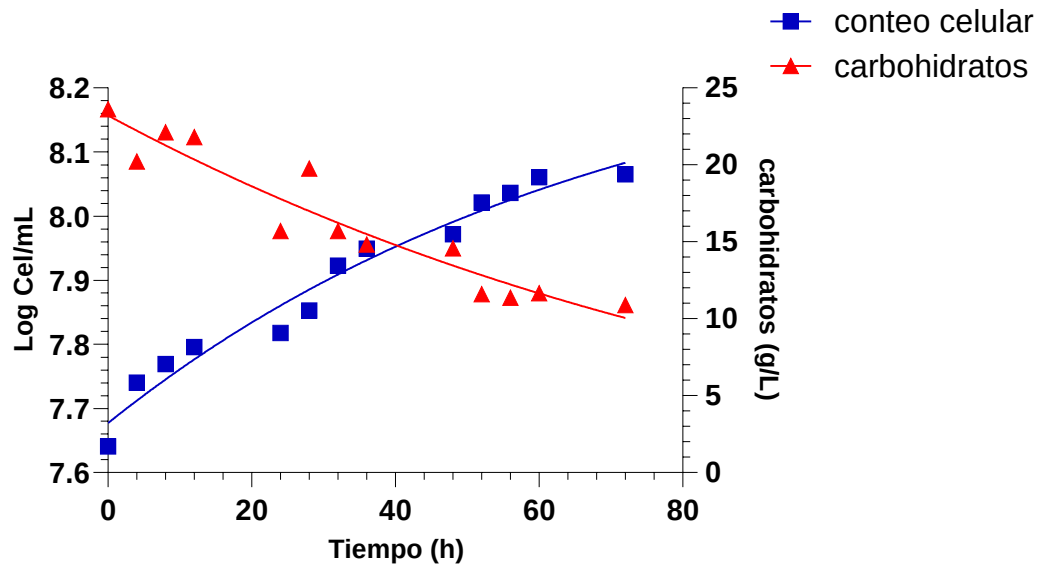
los cuales se desarrollaron replicas resultando en un total de seis muestras analizadas.



Gráficos 1: Desarrollo del L Cassei en una concentración al 5% del inoculo.



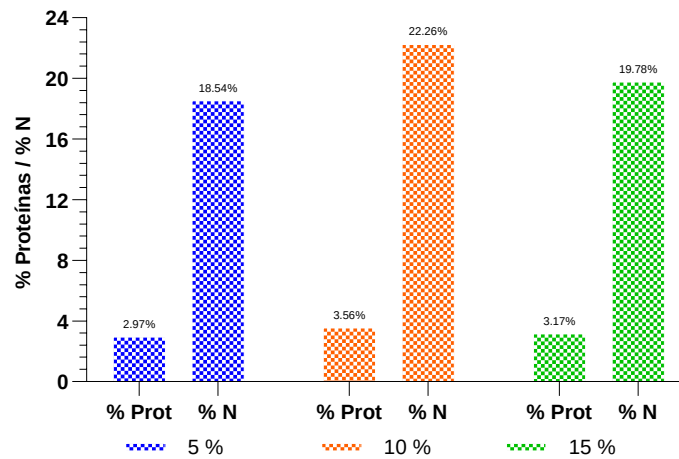
Gráficos 2: Desarrollo del L Cassei en una concentración al 10% del inoculo.



Gráficos 3: Desarrollo del *L. Casei* en una concentración al 15% del inoculo.

La biomasa obtenida posterior a la cinética del *L. casei* sobre el residuo cervecero artesanal, muestra una importante disminución en el consumo de los carbohidratos en un lapso de 72 horas, lo cual permitió mantener el crecimiento celular en forma estable generando una biomasa rica en proteínas con un importante potencial para el consumo humano.

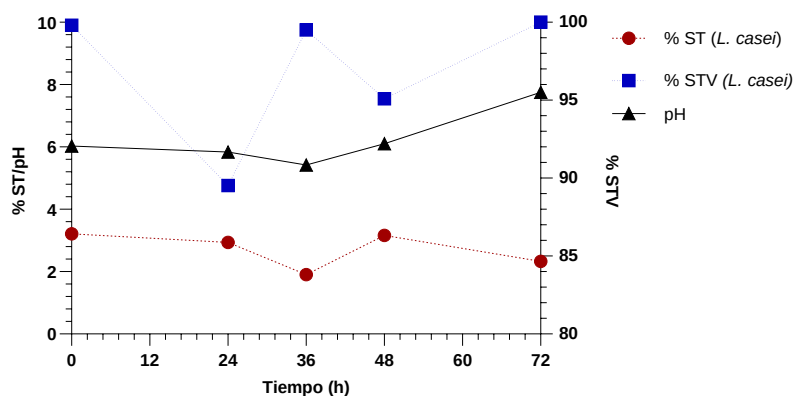
A su vez que los niveles de nitrógeno/proteínas en sus diferentes concentraciones se notó un aumento exponencial, siendo la del inoculo del 10% que mostro un mayor rendimiento a contraparte de las concentraciones del 5% y 15%.



Gráficos 4: Niveles de Nitrógeno y proteínas previo y posterior al desarrollo de la cinética.

Los porcentajes de Sólidos Totales de las cinéticas disminuyeron de forma considerable en el tiempo establecido de las 72hrs, en el caso de los Sólidos Totales Volátiles se observó una disminución del 89% en las 24 horas, el cual más tarde a las 12 horas tuvo un aumento al 100% y nuevamente una disminución en la hora 48 con un 95% de S.T.V el cual finalizó nuevamente con un 100% en la hora 72.

Los niveles de pH se mantuvieron estables con una media de 5.90 teniendo un punto máximo de 7.75 en las 72 horas.



Gráficos 5: Porcentajes de Sólidos Totales, Sólidos Totales Volátiles y pH de la cinética anaeróbica del L Cassei.

4.2 Tratamiento a partir de la Microalga *Nanocloropsis Oculata*

Se realizó el muestreo del sustrato (Residuo Bovino) en el municipio de Ixhuatlancillo, Veracruz del cual se realizó la caracterización preliminar físico-química (pH, ST, D.Q.O., etc.), como parte de los objetivos establecidos en el trabajo de investigación desarrollado. Del cual dentro de sus parámetros físicos se obtuvo una estadística elevada en los S.T.V. junto con un pH elevado siendo este un medio alcalino, en el caso de los parámetros químicos se observaron niveles elevados en la D.Q.O. y la D.Q.O. soluble, junto con el aparatado microbiológico se confirmó la presencia de microorganismos en el sustrato (*Coliformes Fecales*).

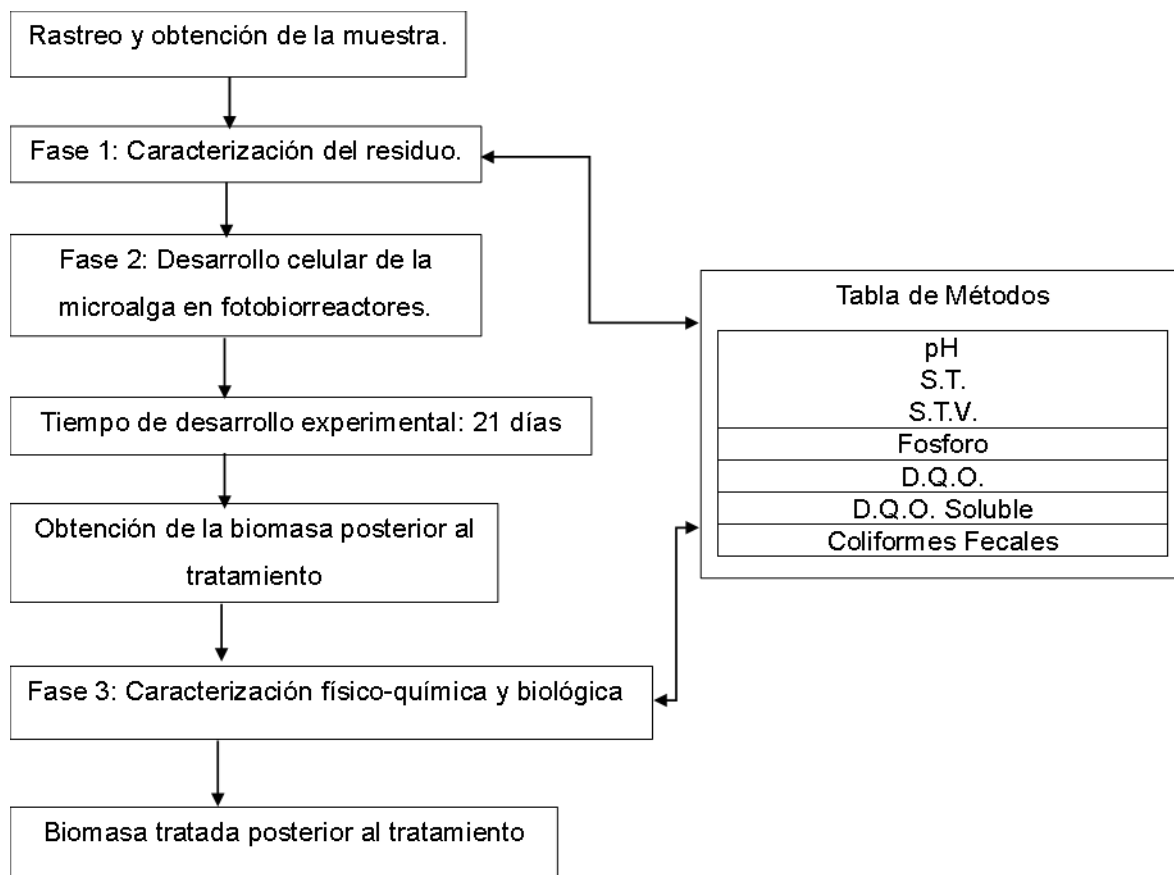


Ilustración 8: Desarrollo experimental de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.

Durante el desarrollo poblacional de la Microalga en el residuo bovino tuvo un crecimiento acelerado en los primeros cinco días en una concentración del 45%, a diferencia de las de menor concentración, de las cuales no consiguieron adaptarse en su totalidad, de lo cual decreció su fase de desarrollo posterior al séptimo día del tiempo establecido, a lo cual, sin presentar niveles de nitrógeno necesarios, consiguió desarrollarse en el medio.



Ilustración 9: Microalga Nanocloropsis Oculata observada desde un microscopio usando el objetivo 40X durante el conteo celular en cámara de Neubauer

Además, se observó que las variaciones de pH fueron mínimas teniendo una media de 8.40 de la cual únicamente se notaron fluctuaciones a partir de un pH de 09, de la cual el fotobiorreactor con 45% de concentración de microalga tuvo una disminución significativa en los niveles de pH siendo la moda de 7.75, a diferencia de las concentraciones menores, mantuvieron sus niveles de pH similares. Comparado con resultados obtenidos por Kulsoom (2023) quien utilizó este agente microbiano previamente en residuos de origen marino (Residuos de Pescado), residuos de ganado, aves de corral, estiércol, vegetales y mezclas, respectivamente. Llegando a hacer una remoción en los niveles de Nitrógeno amoniacal en un 11,7%, 8%, 5%, 11,3%, 6,1% y 3,8%.

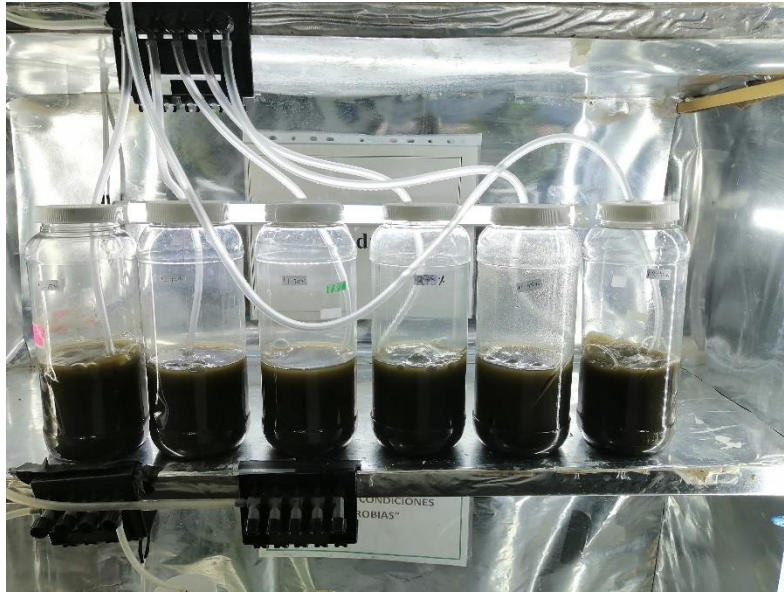
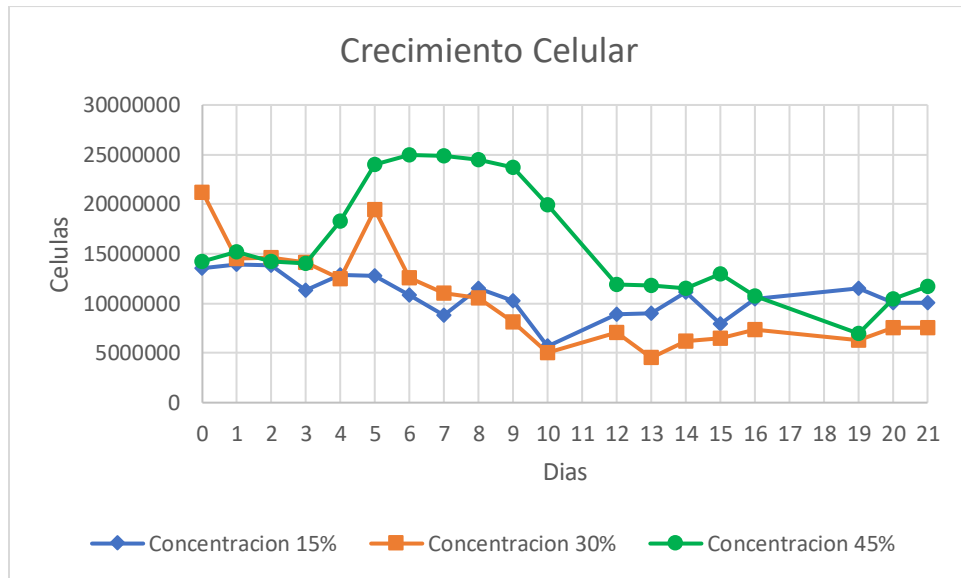


Ilustración 10: Fotobiorreactores tipo Batch durante el desarrollo celular inicial de la microalga *Nanocloropsis Oculata* (Día 0).

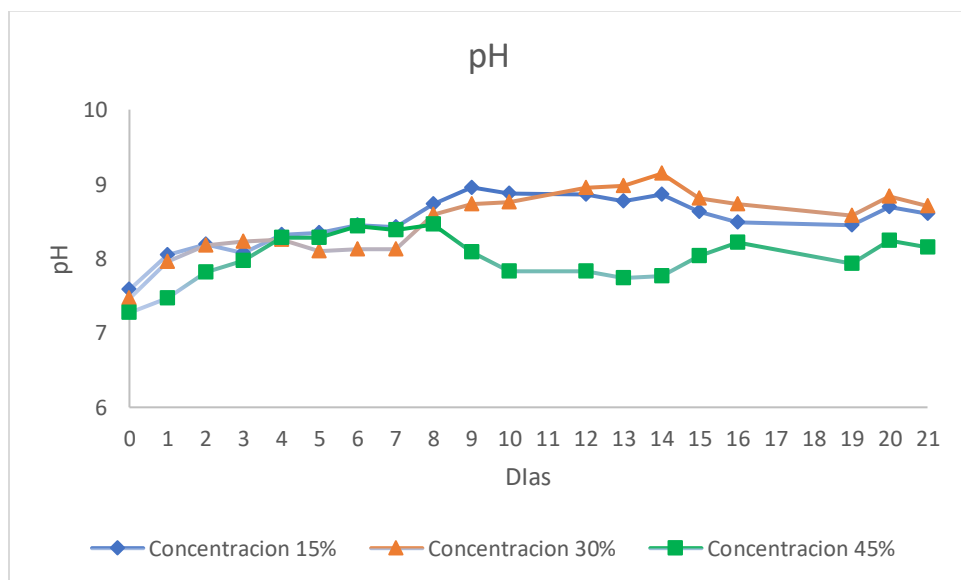
Lo que se puede comprender es que puede ser utilizado como un agente para la biorremediación de desechos ya sean de origen ganaderos o agrícolas, lo cual varia sus desempeños si dependiendo del origen del sustrato puede llegar afectar directamente el crecimiento celular del mismo.



Ilustración 11: Desarrollo de la Microalga *Nanocloropsis Oculata* (Día 7)



Gráficos 6: Desarrollo de la Microalga *Nanocloropsis Oculata*.



Gráficos 7: Monitoreo de pH de la cinética de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.

Respecto a los Sólidos totales generados, las de concentraciones de 15% y 35% se observó que tuvieron una disminución mínima, casi lineal en los 21 días establecidos, a diferencia de la de mayor concentración la cual tuvo un repunte considerable en los días posteriores.

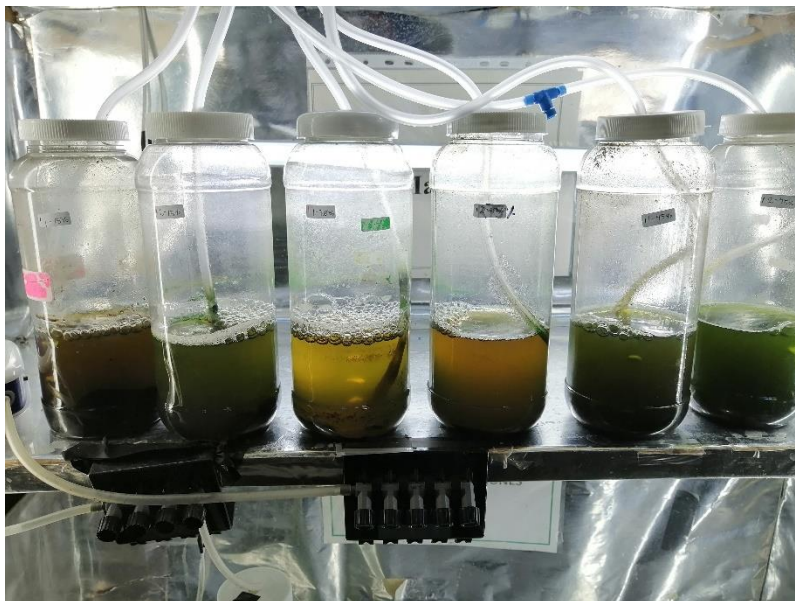


Ilustración 12: Desarrollo de la microalga *Nanocloropsis Oculata* (Día 14)

Caso contrario al de mayor porcentaje que se observó una disminución gradual, con la excepción de que en el día 12 se obtuvo un repunte en la generación de los mismos.

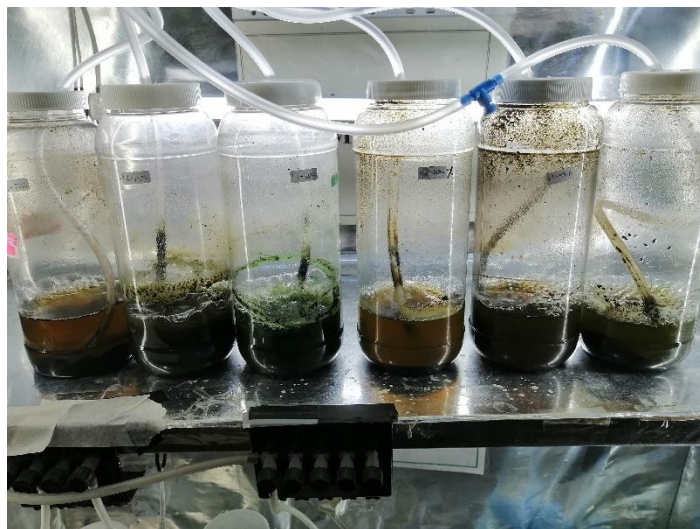
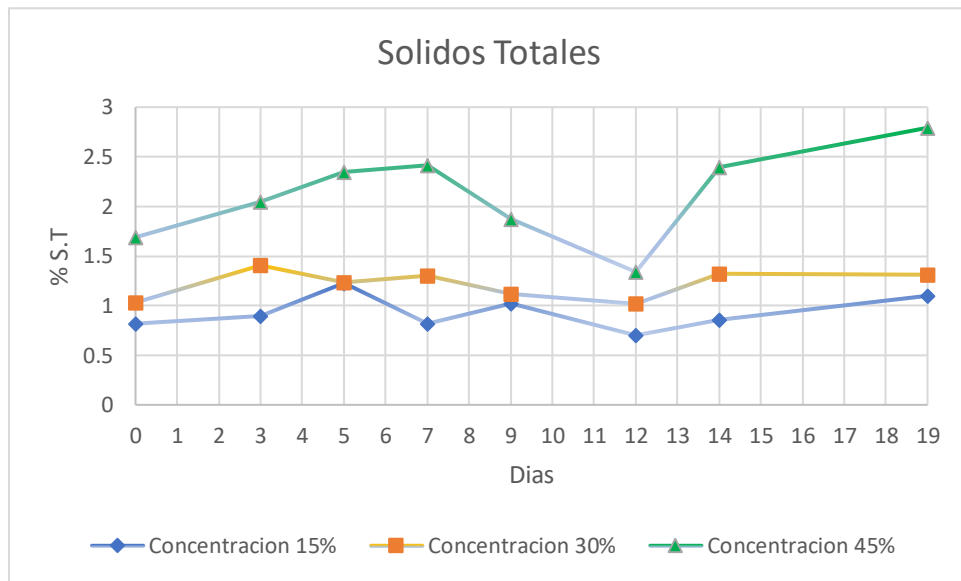
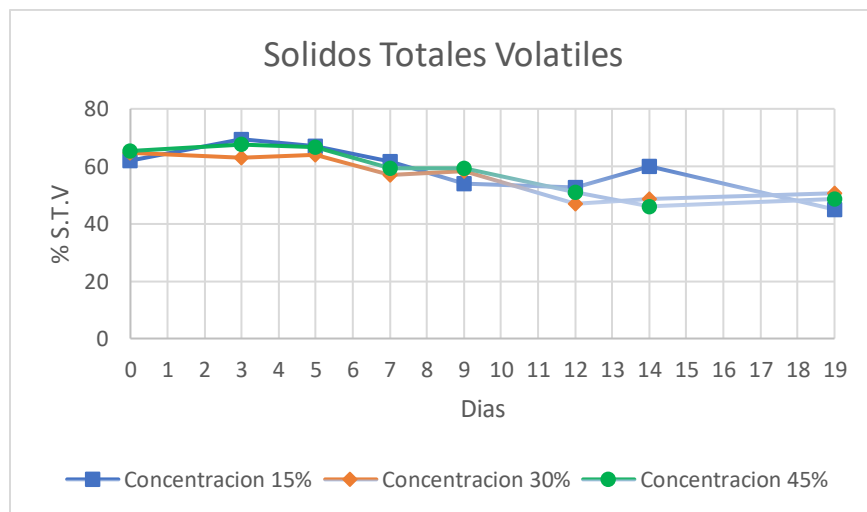


Ilustración 13: Día final de desarrollo de la microalga *Nanocloropsis Oculata* (Día 21)

En cuestión de los Solidos Totales Volátiles tuvieron una disminución progresiva de la microalga, donde el valor mínimo fue del 46%. Además de que se observó un repunte en el día 14 con un porcentaje del 62%.



Gráficos 8: Sólidos Totales generados de la cinética de la microalga *Nanocloropsis Oculata*



Gráficos 9: Sólidos Totales Volátiles de la cinética de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.

Los niveles de DQO y DQO Soluble en la cinética de la microalga usada, se observó que en las concentraciones del 15% y 30% no se consiguieron remover los niveles de DQO necesarios para el tratamiento del residuo, sin embargo, en el caso de la concentración del 45%, fue la que se obtuvo un mejor desempeño en la remoción de DQO y DQO soluble presente en el medio.



Ilustración 14: Espectrofotómetro (Thermo Genesys 20), utilizado para la medición de absorción de las muestras de interés.

En contraste a los resultados propuestos por Sales-Pérez et al. (2023) el cual determino que se pueden llegar a remover varios agentes contaminantes u otras características fisicoquímicas del medio como puede ser la Demanda Química de Oxígeno Soluble con concentraciones del 10% del inoculo.



Ilustración 15 Muestras posterior a digestión habiendo usado la placa de calentamiento (Muestras de D.Q.O. lado izquierdo, Blanco ubicado en el centro, Muestras de D.Q.O. Soluble lado derecho).

También se determinó de que en concentraciones elevadas de este mismo se puede obtener una remoción con un porcentaje del 37.18%, se pueden apreciar en medios como es el caso del agua residual utilizada en el estudio mencionado.



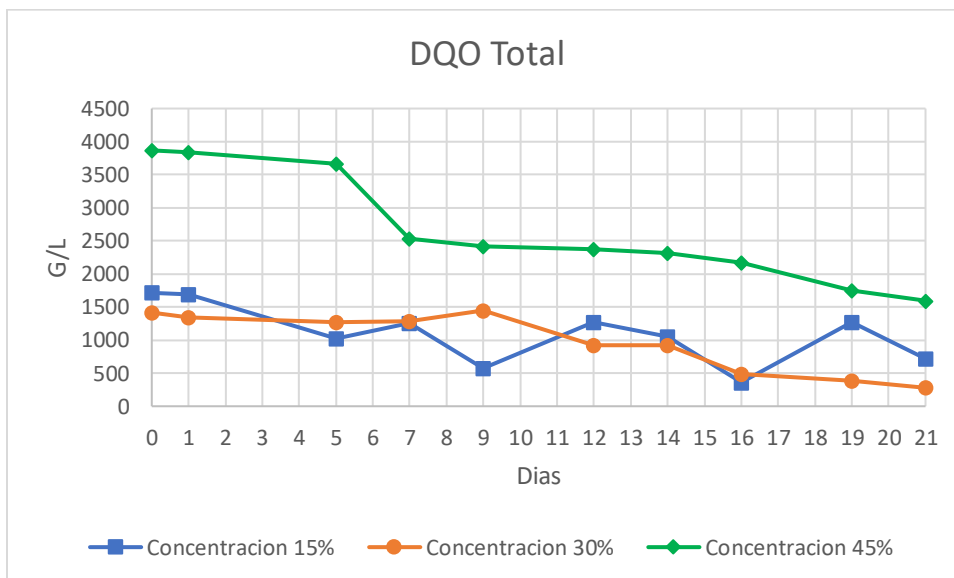
Ilustración 16: Placa de calentamiento (Felisa), utilizada para el desarrollo de la técnica de determinación de D.Q.O., para la digestión de las muestras de interés

Un caso similar descrito por Salwa Hafidzahet al (2024) donde menciona que en medios como es el desecho de aguas ricas en azúcares (Carbohidratos) han conseguido tener remociones de hasta un 64.98% y 66.45%, en el cual los parámetros a destacar son; SST, DQO y DBO.

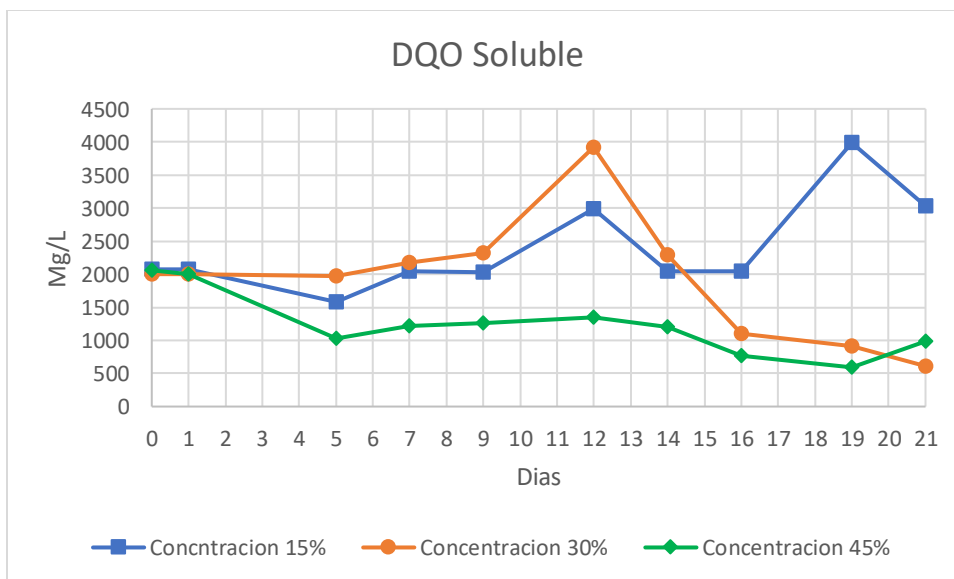
Se observó que una disminución significativa de la demanda química de oxígeno total (D.Q. O) (*Grafica 10*). Entre los días 5 y 6 de la cinética con concentración del 45%, en contraste con la de concentración del 30% la cual a partir del día 9 al 11 disminuyó gradualmente, sin embargo, el lote el cual poseía una concentración del 15/ se observó picos de incrementos de la D.Q.O. soluble el cual al mismo tiempo disminuían a lo largo del tiempo establecido, a lo que finalmente se obtuvo una disminución para el día 21

En el caso de la demanda química de oxígeno soluble (D.Q.O. soluble) (*Grafica 11*), se observó un incremento exponencial en el lote con concentración del 30% el cual se obtuvo una disminución del parámetro a partir del día 12, en el caso del cual poseía una concentración del 45% se mantuvo con niveles bajos desde el día

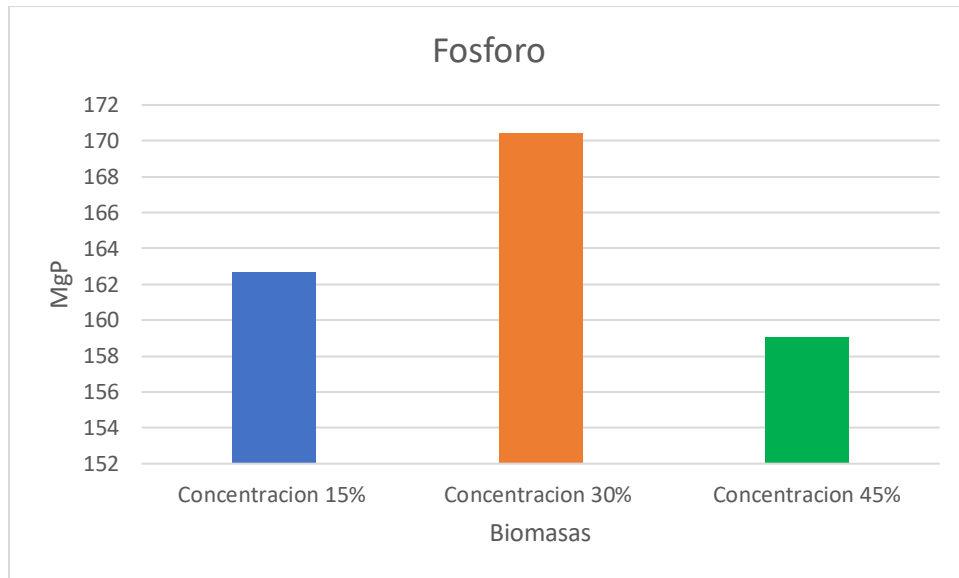
inicial (día 0), a comparación con la que posee una concentración del 15% la cual se tuvo un aumento a partir del día 16 hasta el día 21 que empezó a disminuir nuevamente.



Gráficos 10: Niveles de DQO de la cinética de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.



Gráficos 11: Niveles de DQO Soluble de la cinética de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.



Gráficos 12: Niveles de Fósforo de la biomasa microalgal generada.

Las cantidades de Fosforo en las biomasas generadas de las cinéticas montadas, nos muestran que la de concentración del 30% posee una cantidad elevada contrastada a las de 15% y 45%.



Ilustración 17: Ejecución de la metodología de determinación de Fosforo en muestra de residuo Bovino

Comparado con resultados descritos por Mehra y Jutur (2022) que detalla que para mejorar el rendimiento de las biomasas utilizando el método de un factor a la vez (OFAT), posterior a nueve días de cultivo se obtuvieron resultados que la concentración máxima de biomasa alcanzada fue de 576 mg L^{-1} , en comparación

con 460 mg iniciales por lo que se resume en una mejora en sus rendimientos generados con este método.



Ilustración 18: Preparación de reactivo combinado para la determinación de Fosforo, previo a la medición de absorbancia mediante el uso del Espectrofotómetro.

En las biomasas micro algales generadas, del 15% y 45% se muestra una cantidad mínima de coliformes fecales presentes, el cual se expresa en NMP (Numero Mas Probable)

Tabla 6: Resultados de la determinación de coliformes fecales en base a las biomasas micro algales generadas en sus diferentes concentraciones (15% y 45%).

BIOMASAS	UNIDAD	PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR
15%	NMP	3×10^2
45%	NMP	4×10^2

4.3 Conteo Celular de la microalga *Nanocloropsis Oculata* y del Lactobacilo *Lactobacillus Casei*

Se realizó el monitoreo celular de la microalga (*Nanocloropsis Oculata*) y el probiótico (*Lactobacillus casei*) en el residuo Agroindustrial (Bovino), el cual se utilizó un Microscopio Zeiss, Primo Star, UNAM 02504632.

Se realizó el conteo celular con el objetivo 40X y 100X auxiliándose con el aceite de Inmersión para el conteo de los lactobacilos junto con la microalga, a su vez se utilizó la cámara de Neubauer a su vez con un contador celular, con la cuadrícula de la propia cámara se facilitó el conteo de células por Litro.

Esto debido al tamaño de las células se tomó en consideración la zona central de la cuadrícula de la cámara, lo cual facilitó el conteo (tamaño aproximado de 2 a 200 μm).

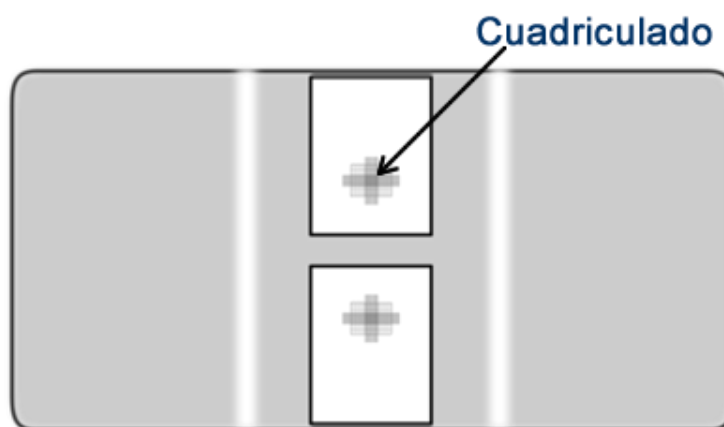


Ilustración 19: Esquema de la Cámara de Neubauer, indicando la zona designada para la realización del conteo celular.

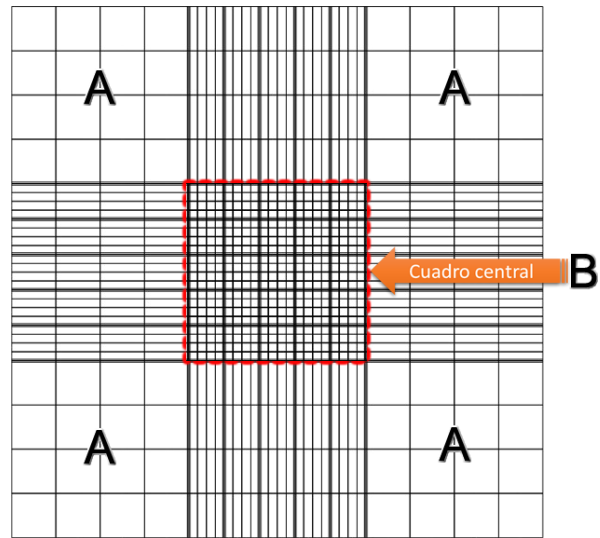


Ilustración 20: Zona central de la cámara de Neubauer



Ilustración 21: Microscopio Zeiss Primo Star, UNAM 02504632, empleado para el conteo celular de los agentes biológico.

CONCLUSIONES

El uso de agentes remediadores biológicos para el tratamiento de residuos agroindustriales *Nanocloropsis Oculata* y *Lactobacillus casei*, tuvieron crecimientos poblacionales elevados, cumpliendo con los objetivos propuestos en el tema de investigación a tratar.

El residuo bovino que se caracterizó se obtuvo una nula presencia en los Niveles de Nitrógeno y proteínas partiendo de la base de datos generada, se determinó que se necesitan concentraciones de la Microalga en un 45% o superiores para su desarrollo en el medio a tratar, a la vez que factores abióticos como lo son; intensidad lumínica, pH. afecta directamente en el crecimiento del organismo en cuestión.

Se concluye que para el parámetro de D.Q.O. total se obtuvo una disminución progresiva, a diferencia de la D.Q.O. Soluble no se obtuvo una disminución en todas sus concentraciones, la cual en el fotobiorreactor del 15% se observó un aumento en su concentración en el día número 19. Además del cual se obtuvo una notoria reducción en los sólidos totales, sedimentando en gran medida parte del residuo teniendo un desarrollo máximo en el día número 16 de la cinética, lo cual a su vez obtuvo biomasa.

Las biomasas micro-algales obtenidas presentaron una reducción importante en algunos de los parámetros establecidos de los cuales se realizó el método de conteo de coliformes fecales de los cuales mostro una baja concentración de los agentes microbiológicos previamente mencionados lo que indica que la microalga *Nanocloropsis Oculata* es apta y recomendada para la remoción de microorganismos patogénicos.

En el caso del Lactobacilo utilizado para el residuo cervecero artesanal utilizando métodos de fermentación anaerobia, se observó que en bajas concentraciones del LCG al 5% se tiene un crecimiento poblacional elevado en un lapso de 12hrs, a la vez que los niveles de carbohidratos disminuyen de forma progresiva, lo cual nos indica que con menores concentraciones del inoculo, se obtienen mayores rendimientos de generación de biomasa rica en proteínas.

RECOMENDACIONES

Para el residuo bovino utilizado para el desarrollo y crecimiento de la microalga *Nanocloropsis Oculata*, es recomendable realizar un tratamiento térmico, esto con la finalidad de realizar una remoción de agentes biológicos contaminantes (*Coliformes Fecales*, entre otros), de los cuales llegan a influir en el crecimiento celular de la microalga *Nanocloropsis Oculata*.

Para mantener un crecimiento poblacional de la microalga utilizada, se puede adicionar parte del residuo bovino para que sea un sistema semicontinuo (Adicionar cantidades controladas del sustrato).

BIBLIOGRAFIA

1. (Caracterización del perfil lipídico de la microalga *Nannochloropsis Oculata* Por GC-MS., 2015, p. Pp 14)
2. Adminmedix. (2018, September 17). 1 de cada 10 Ingresos por uso Inadecuado de Medicamentos. Medix. <https://medix.com.mx/1-10-ingresos-por-uso-inadecuado-medicamentos/>
3. Aguiar, S., Estrella, M. Á. E., & Uvidia, H. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. *Axioma*, 1(27), 5-11.
4. Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Ramírez-Medrano, A., Aguilar-Yáñez, J. M., & Álvarez, M. M. (2009). Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 8(1), 67-76.
5. Ammar, S. H., Khadim, H. J., & Mohamed, A. I. (2018). Cultivation of *Nannochloropsis Oculata* and *Is Chrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology and Innovation*, 10, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.002>
6. Bagazo de cerveza húmedo | FEDNA. (n.d.2021).
7. Bagazo de cerveza: un subproducto con múltiples aplicaciones. (2019). Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca.
8. Casas, G. A. (n.d.). Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos (2020).
9. Casas-Godoy, L., Fábían, G., & Cvu. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Revista Digital Universitaria*, 15(12).
10. Castro-Criado, D., Abdullah, J. a. A., Romero, A., & Jiménez-Rosado, M. (2023). Stabilization and valorization of beer bagasse to obtain bioplastics. *Polymers*, 15(8), 1877.
11. Cómo reutilizar los residuos ganaderos y obtener valor agregado. (2019, August 5). Agrofya News.

12. Cravo, G., & Crespo, L. (2022). sustratos no convencionales y su aplicabilidad en la producción de *Lactobacillus casei*: (unconventional substrates and their applicability in the production of *Lactobacillus casei*).
13. De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (n.d.). Agroindustria, motor de desarrollo. [gob.mx. https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/agroindustria-motor-de-desarrollo](https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/agroindustria-motor-de-desarrollo)
14. De Información Agroalimentaria Y Pesquera, S. (s. f.). Producción agrícola. [gob.mx. https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119](https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119)
15. Dietrichson, A., PhD. (n.d.). 4.2 Propiedades de la curva normal | Métodos Cuantitativos.
16. El bagazo de cerveza o cebadilla (Brewer's spent grains en inglés) es un subproducto de la producción de cerveza. (2021). Redivia.
17. Fotobiorreactores SCHOTT. (s. f.).
18. Ganadero, C. (2023, March 25). ¿Cómo aprovechar los residuos a lo largo de la cadena cárnica? CONtexto Ganadero.
19. Gárate Osuna, A. J. (2022). Análisis del comportamiento de *Nannochloropsis oculata* cultivada en un fotobiorreactor bajo condiciones de estrés térmico. *Identidad Energetica*, 5(2).
20. González, B., Domínguez-Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. *ciencia y tecnología alimentaria*, 6(2), 152-157.
21. González, O. G. M. (2014b). Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano. *Repositorioslatinoamericanos*.
22. Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9.

23. Hoja técnica *Nannochloropsis oculata*. (2021d. C., marzo 7).
24. Huang, C., Li, S., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Frontiers in Microbiology*, 9.
25. Hurtado, J. B., Tarifa, M. C., Iturmendi, F., & Brugnoli, L. I. (2021, September 27). Supervivencia de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en jugo de pera durante el almacenamiento en refrigeración.
26. Ickis, J., Leguizamón, F., Metzger, M., & Flores, J. (2009). La agroindustria: campo fértil para los negocios inclusivos. *Academia-revista Latinoamericana De Administracion*, 4(43), 107-124.
27. Jimmy, N. P., & Agroindustrial. (2020, November 24). Optimización estadística de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero por *Lactobacillus casei*.
28. Kagan, M., & Matulka, R. A. (2015). Safety assessment of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Toxicology Reports*, 2, 617-623.
29. Kulsoom, S., S. Suji. (2023). Analysis of the deodorization of biodegradable waste using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*. *Journal Of Survey In Fisheries Sciences*, 10.
30. *Lactobacillus casei*. (n.d).
https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M14376_02_02.html
31. LACTICASEIBACILLUS CASEI: Overview, uses, side effects, precautions, interactions, dosing and reviews. (n.d.).
32. Liliana, S. C., & Misael, C. R. (2022). Viabilidad de *Weissella cibaria* durante los procesos integrados de fermentación y encapsulación utilizando residuos agroindustriales en la formulación del sustrato y doble emulsión seguido de coacervación compleja en la encapsulación. Dialnet.
33. Mehra, A., & Jutur, P. P. (2022). Application of response surface methodology (RSM) for optimizing biomass production in *Nannochloropsis oculata* UTEX 2164. *Journal Of Applied Phycology*, 34(4), 1893-1907.
34. Melina, T. S., Diesser, D., Bongiovani, N., Felipe, R. P. A., Hurtado, J., Diego, R. P., & Tarifa, M. C. (2022, October 1). Obtención y caracterización

de los sobrenadantes resultantes de la biotransformación de subproductos industriales por *Lactobacillus casei*.

35. Menegazzo, M. L., & Fonseca, G. G. (2019b). Biomass recovery and lipid extraction Processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 107, 87-107.
36. Método estándar 2450G de la APHA-AWWA-WPFC (1999).
37. Método estándar 2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999).
38. Monteiro, C., Malavazi, B., Mendes, M., Berwig, K., Raniero, G., Monteiro, A., y Clifford, M. (2019). Biomaterial Based on Brewing Waste and Vegetable Resin: Characterization and Application in Product Design. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 475-480.
39. Obeid, S., Beaufile, N., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 34, 49-56.
40. Parés-Casanova, P. M. (n.d.). Comparación de modelos no lineales para describir curvas de crecimiento en la cabra catalana.
41. Pensis. (2015, March 30). El poder de las microalgas. Pensis.
42. Qiu, C., He, Y., Huang, Z., Qiu, W., Huang, J., Wang, M., & Chen, B. (2021). Biosafety Evaluation of *Nannochloropsis oculata* and *Schizochytrium* sp. oils as novel human milk fat substitutes. *Food & Function*, 12(7), 2972-2984.
43. Rojas, L. F., Zapata, P., & Ruiz-Tirado, L. (2022). Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 34, 100585.
44. Ruiz Morales, M. (2011). Taller de elaboración de lombricomposta. U NIVERSIDAD IBEROAMERICANA.
45. Sales-Pérez, R. E., Sales-Chávez, R. M., Romero-Mota, D. I., Estrada-García, J., & Méndez-Contreras, J. M. (2023). Removal of organic matter during adaptation of *Nannochloropsis oculata* in livestock waste. *Renewable Energy Biomass & Sustainability*, 5(2), 32-39.

46. Salwa Hafidzah, S. H. A. (2024). Bioremediation of sugar waste water using *nannochloropsis oculata* to reduce pollutant levels and turbidity. *Indonesian Journal Of Earth And Human*, Vol 1, 1.
47. Siciliano, R., Pannella, G., Lippolis, R., Ricciardi, A., Mazzeo, M. F., & Zotta, T. (2019). Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome. *International Journal of Food Microbiology*, 298, 51–62.
48. Singh, R., Das, R., Sangwan, S., Rohatgi, B., Khanam, R., Peera, S. K. P. G., Das, S., Lyngdoh, Y. A., Langyan, S., Shukla, A., Shrivastava, M., & Misra, S. (2021). Utilisation of agro-industrial waste for sustainable green production: a review. *Environmental Sustainability*, 4(4), 619–636.
49. Timetoast. (2021). Historia de la Agroindustria timeline. Timetoast Timelines.
50. Wang, W., Jie-Long, Z., Qian, Y., Zhou, J., Mao-Lin, L., Gu, R., & Huang, Y. (2021). Structural and compositional changes of whey protein and blueberry juice fermented using *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus casei* during fermentation. *RSC Advances*, 11(42), 26291–26302.
51. Yaashikaa, P., Kumar, P., & Varjani, S. (2022). Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresource Technology*, 343, 126126. [ht](#)
52. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.