



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Incremento en la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus
pluvialis* cultiva en agua residual de invernadero

TESIS

Que como parte del requisito para obtener el grado de maestro en Ingeniería en
Biosistemas

Presenta

Biol. Benito Parra Pacheco

Dirigida por:

Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo
Presidente

Dra. Claudia Gutiérrez Antonio
Secretario

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Vocal

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente

Dr. Juan Manuel Morales Vera
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo, 2020.

México

Dedicatorias

Con una dedicación muy especial a mi madre, a quien le doy las gracias por guiarme y cuidarme desde donde quiera que se encuentre, a mi padre por ser el soporte durante mis estudios, gracias a los dos por confiar en lo que siempre soñé.

A mis hermanos, Lorenzo, Gabriela, Fidel y Adrián, ¡gracias por mantenerme a flote ante cualquier situación!

A todos mis sobrinos Jessica, Alondra, Yeshua, Yngwie, Sofía, Zuriel, Ethan, Humberto, Daniela y Adolfo, ¡a todos ellos por inspirarme a ser cada día mejor!

A Adolfo Barrón y en especial a Humberto Barrón, por enseñarme que la vida no es fácil, y que debo luchar por cada meta que tengo en la vida, ¡gracias por estar conmigo en cada paso que doy!

A mis compañeros de viajes y aventuras, Belinda de la Cruz y Rafael Sánchez, ¡gracias por apoyarme en todo momento!

¡gracias por todo y por tanto!

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto.

A mi maestro Dr. Juan Fernando García Trejo, por guiarme y mostrarme el camino en la ciencia, ¡gracias por dedicarme el tiempo suficiente para formar un ser humano con un pensamiento distinto, y ayudarme a ver la biología desde otro horizonte!

A mis sinodales, Dra. Claudia Gutiérrez, Dra. Angélica Feregrino, Dr. Ramón Guevara y Dr. Manuel Morales, por brindarme su tiempo para ayudarme a realizar este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioingeniería por el apoyo y tiempo que me dedicaron durante la elaboración del proyecto.

A la Ing. Mayra Salinas Romero, ¡por todo el apoyo brindado en el laboratorio de microalgas!

A la empresa Finka Ahuehuetes (United Farms) por el apoyo recibido para el desarrollo del proyecto.

Índice

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes.....	6
2.1	Microalgas	6
2.2	Pigmentos.....	6
1.3	<i>H. pluvialis</i> como fuente productora del carotenoide astaxantina	7
1.4	Astaxantina	8
1.5	Síntesis de astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i>	8
1.6	Sistemas productores de microalgas	10
1.7	Estimación costo de producción de astaxantina	11
1.8	Métodos para la producción y obtención de astaxantina de la microalga <i>H. pluvialis</i>	11
1.8.1	Luz	11
1.8.2	pH.....	15
1.8.3	Temperatura.....	18
1.8.4	Fuente de carbono CO ₂	20
1.8.5	Fosforo y nitrato	21
1.8.6	Fitohormonas	21
1.8.7	Electricidad.....	22
1.8.8	Expresión de genes.....	22
1.9	Alternativa al medio de cultivo para <i>H. pluvialis</i>	23
1.10	Usos y aplicaciones de <i>H. pluvialis</i>	24
1.11	Método de extracción de astaxantina	25
III.	Hipótesis	27
IV.	Objetivos	28
3.1	Objetivo general.....	28
3.2	Objetivos particulares.	28
V.	Material y métodos.....	29
5.1.	Limpieza área de trabajo (Campana de Flujo Laminar)	29
5.2.	Cepa axénica.....	29

5.3.	Mantenimiento de la cepa.....	29
5.4.	Escalamiento de la microalga	30
5.5.	Curva de calibración Peso Seco.....	30
4.6	Tasa de crecimiento (r).....	31
4.7	Depuración y esterilización del agua residual de invernadero	32
4.8	Cuantificación de fosfatos y nitratos del agua residual de invernadero. ...	32
4.9	Preparación de medio de cultivo comercial y agrícola	33
4.9.1	Medio de cultivo comercial Basal de Bold	33
4.9.2	Medio de cultivo agrícola.....	34
4.10	Ajuste de pH	35
4.11	Monitoreo de luz y temperatura	36
4.11.1	Luz	36
4.11.2	Temperatura	36
4.12	Experimento consumo de nutrientes	37
4.13	Ajuste de medio de cultivo agrícola	38
4.14	Experimento pH.....	38
4.15	Experimento temperatura	39
4.16	Experimento luces	39
4.17	Estimulación de la producción de astaxantina mediante diferentes tipos de luz. 39	
4.18	Extracción y cuantificación de carotenoides y astaxantina	40
4.19	Análisis de datos	40
VI.	Resultados y discusión	41
6.1.	Mantenimiento y escalamiento de cepa axénica.....	41
5.2	Curva de calibración peso seco	42
5.3	Monitoreo de Temperatura	43
5.4	Monitoreo de luz	44
5.5	Experimento consumo de nutrientes.....	45
5.6	Ajuste de medio de cultivo agrícola.	52
5.7	Experimento pH	53

5.8	Experimento temperatura	57
5.9	Experimento de luces	61
5.10	Experimento tipo de luces.	65
VII.	Conclusiones.....	69
VIII.	Bibliografía	70

Dirección General de Bibliotecas UAG

Índice de tablas

Tabla 1: Composición de macro y micronutrientes del medio de cultivo Basal-Bold elaborado en el laboratorio de microalgas.	34
Tabla 2: Composición de medio agrícola para el riego hidropónico de jitomate en invernadero.	35
Tabla 3: Tasa de crecimiento y producción en gramos por litro de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medio de cultivo Basal de Bold a distintas concentraciones.	52
Tabla 4: Concentración de nitratos y fosfatos (mg/L) contenidos en el medio de cultivo agrícola y Basal de Bold.	53
Tabla 5: Tasa de crecimiento y producción en gramos por litro de <i>H. pluvialis</i> cultivada en agua residual de invernadero a diferentes pH, y Basal de Bold como control.	57
Tabla 6: Tasas de crecimiento producción en gramos por litro de la microalga <i>H. pluvialis</i> , cultivada en agua residual de invernadero y Basal de Bold a tres temperaturas distintas.	60
Tabla 7: Tasa de crecimiento y producción de biomasa de la microalga <i>H. pluvialis</i> cultivada en agua residual de invernadero expuesta a tres intensidades de luz....	64
Tabla 8: Tasa de crecimiento y producción de biomasa de <i>H. pluvialis</i> sometida a distintos tipos de luz a 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	67

Índice de figuras

Figura 1: Ruta biosintética de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> . Fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), z-caroteno desaturasa (ZDS), licopeno ciclasa (LCYB), b-caroteno ketolasa y carotenoide hidroxilasa (CH). Traducido y redibujado de Steinbrenner <i>et al.</i> , 2001.....	9
Figura 2: Escalamiento de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medio de cultivo comercial Basal del Bold (1, 2 y 3) y en medio de cultivo agrícola similar al agua residual de invernadero (4 y 5).....	42
Figura 3: Curva de Calibración de peso seco de la microalga <i>H. pluvialis</i>	43
Figura 4: Monitoreo de temperatura ambiental dentro del laboratorio de microalgas por 24 horas (prueba previa a los experimentos).....	44
Figura 5: Establecimiento y prueba de sensor y emisión de luz de la lámpara Philips a $120 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ con un fotoperiodo de 8 horas encendido y 16 horas apagado, durante 24 horas previo al establecimiento de los experimentos.....	45
Figura 6: Diseño de cultivo de <i>H. pluvialis</i> en diferentes concentraciones de medio de cultivo Basal de Bold.....	46
Figura 7: Concentración inicial de nitratos en los tres medios de cultivo Basal de Bold utilizado para el experimento de consumo de nutrientes.....	47
Figura 8: Consumo de nitratos por la microalga <i>H. pluvialis</i> , a distintas concentraciones del medio de cultivo Basal de Bold durante 16 días.	48
Figura 9: Concentración inicial de fosfatos en los tres medios de cultivo Basal de Bold utilizado para el experimento de consumo de nutrientes.....	49
Figura 10: Concentración inicial y final de fosfatos en medio de cultivo Basal de Bold a distintas concentraciones.....	50
Figura 11: Análisis estadístico para las diferentes concentraciones del medio de cultivo con respecto a la producción de la microalga. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa.	51

Figura 12 : Experimento de pH de <i>H. pluvialis</i> en agua residual de invernadero (Izquierda, diseño realizado en SketchUp: Software de diseño 3D, derecha sistema construido).	54
Figura 13: Oscilación del valor de pH durante el experimento, los picos superiores muestran el pH registrado en cada toma de muestra, mientras que los picos inferiores muestran el pH ajustado.	55
Figura 14: <i>H. pluvialis</i> cultivada en agua residual de invernadero a distintos pH, debido a que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa.	56
Figura 15: Diseño y sistema del cultivo de la microalga en agua residual de invernadero a distintas temperaturas.	58
Figura 16: Análisis estadístico para el cultivo de microalga en agua residual de invernadero a diferentes temperaturas	58
Figura 17: Diseño y sistema del cultivo de la microalga en agua residual de invernadero a 150, 500 y 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$	61
Figura 18: Diferencia de coloración de la microalga <i>H. pluvialis</i> cultivada en agua residual de invernadero a diferentes intensidades de luz (izquierda a derecha): 1000, 500 y 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	63
Figura 19: Producción de microalga a diferentes intensidades de luz cultivada en agua residual de invernadero.	63
Figura 20: Inoculo de <i>H. pluvialis</i> en agua residual de invernadero (arriba izquierda), <i>H. pluvialis</i> a los 8 días de exposición de luz blanca (arriba derecha), azul y roja (abajo izquierda y derecha respectivamente), vista bajo microscopio a 40x, con un fotoperiodo de 11:13 luz-oscuridad.	66
Figura 21: Cultivos de <i>H. pluvialis</i> en agua residual de invernadero sometido a distintos tipos de luz (de izquierda a derecha: luz blanca, azul y roja), a una intensidad de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 10 días.	67
Figura 22: Ajuste de pH (7) durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> sometido a distintos tipos de luz durante 10 días.	68

Resumen

El cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* en agua residual de invernadero de alta tecnología productor de jitomate, resulto ser uno de los mejores métodos para la producción biomasa microalgal y de pigmentos de clase carotenoide. Los valores ajustados del agua residual para la producción de biomasa, fueron a un pH 7, con un intervalo de luz blanca fría de 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, con un fotoperiodo de 11:13 horas luz-oscuridad, a una temperatura de 23 °C, mientras que, para la producción de pigmentos, la emisión de luz de espectro completo de 500 y 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con el mismo fotoperiodo y la misma temperatura, resultaron ser los mejores para la síntesis de pigmentos. Por otro lado, la exposición de la microalga a 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz roja y luz azul, fueron suficientes para el cambio de estado vegetativo a estado de enquistamiento (síntesis de pigmentos).

Por otro lado, la microalga se aclimato y adapto en su totalidad para ser cultivada en agua residual de invernadero, por lo que se puede utilizar como medio de cultivo, sustituyendo totalmente al medio de cultivo comercial, y obteniendo casi los mismos resultados en cuanto a concentración de biomasa microalgal.

Abstrac

Cultivation of *Haematococcus pluvialis* microalgae in tomato-producing high-tech greenhouse wastewater turned out to be one of the best methods for the production of microalgal biomass and carotenoid class pigments. The adjusted values of the residual water for biomass production were at pH 7, with an interval of cold white light of 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, with a photoperiod of 11:13 hours of light-dark, at a temperature of 23 °C, while, for the production of pigments, the full spectrum light emission of 500 and 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ with the same photoperiod and the same temperature, turned out to be the best for pigment synthesis. On the other hand, the exposure of the microalgae to 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ of red light and blue light, were exactly for the change from vegetative state to conquest state (pigment synthesis).

On the other hand, the microalga is acclimatized and adapted in its entirety to be cultivated in greenhouse wastewater, therefore it can be used as a culture medium, completely replacing the commercial culture medium, and obtaining almost the same results in terms of microalgal biomass concentration.

I. Introducción

Las microalgas son un grupo de microorganismos acuáticos fotosintéticos autótrofos que capturan la energía lumínica de la luz solar para convertirla en energía química, y de esta manera acumular una gran cantidad de sustancias químicas (principalmente glucosa), la cual es usada en procesos bioquímicos para la generación de biomasa a través del proceso conocido como fotosíntesis (Gómez, 2007). Todas las sustancias producidas por estos microorganismos mediante sus procesos fisiológicos durante su ciclo de vida han sido de importancia para el sector industrial, algunas de las más importantes y demandadas son; carbohidratos (Piña *et al.*, 2007), proteínas (Pietryczuk *et al.*, 2014), aminoácidos (Hempel *et al.*, 2012) y algunos otros compuestos bioactivos para un uso dentro del sector farmacéutico y nutracéuticos (Jacob *et al.*, 2015).

Otro de los compuestos importantes que son sintetizados por la microalgas son los pigmentos, estos pueden formar parte de la estructura celular, pero su principal función son la captación de diferentes longitudes de onda de la luz proveniente del sol durante el proceso de fotosíntesis, por lo que estos pueden ser sintetizados cuando la célula se encuentra en condiciones óptimas (fisiológicamente). Por otro lado, existen pigmentos que son sintetizados cuando la microalga se encuentra en estado de estrés, y durante este estadio estos pigmentos tienen la función de proteger a la célula del daño oxidativo, lo que permite mantener estable la fisiología de la célula. (Brito *et al.*, 2016).

Existe una gran gama de colores producidos a partir de los pigmentos sintetizados por las microalgas y algunas especies de cianobacterias, estos van desde los verde-azules a los naranja-rojizo dependiendo la concentración que se obtenga (Guerrero *et al.*, 1999). Las fuentes naturales más usadas para la obtención de pigmentos provenientes de las microalgas son: *Arthrospira máxima* (antes *Spirulina*) cianobacteria de la cual se obtiene la ficocianina para la elaboración de alimentos

dando tonalidades azul-verdoso para el consumo humano (Forbes *et al.*, 2017), *beta-caroteno* de la especie *Dunaliella* sp. (Ibañez y Calderos., 2005), y la astaxantina, colorante rojo obtenido de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Shah *et al.*, 2016).

Ahora desde el punto de vista de la mercadotecnia, de acuerdo con Market Research Report (2017), la inversión total para el mercado de astaxantina en el año 2016 fue de 555.4 millones de dólares, dicha cantidad fue alcanzada por la alta demanda de sus aplicaciones como antioxidante y para pigmentación, este último utilizado principalmente en la acuicultura para proveer coloración al alimento para peces, seguido del sector de los nutraceuticos utilizado como antioxidante, después el cosmético y el resto de la producción mundial se encuentra distribuido en distintos sectores con menor demanda. Con base a lo reportado anteriormente, la tendencia hacia el consumo de sustancias de producidas y obtenidas de manera natural que ayuden o proporcionen mejoras a la salud humana ha ido en aumento (Joshi *et al.*, 2003), y gracias a ello se ha permitido el cultivo y/o extracción de pigmentos naturales como la astaxantina a partir de la microalga, esto debido a que es considerada como uno de los pigmentos y antioxidantes más potentes dentro del grupo de los carotenoides (Guerin *et al.*, 2003). Para el año 2000 la inversión hacia la producción de astaxantina fue de 200 millones de dólares, con un precio en el mercado de cerca de 2500 dólares por kilogramo, sin embargo, el 95% de este mercado consume principalmente astaxantina de origen sintético, lo que brinda una oportunidad para competir con pigmento de origen natural a partir de la microalga *H. pluvialis* por los beneficios que tiene en la salud humana y animal (Lorenz y Cysewski., 1999). De acuerdo con el reporte elaborado por Global Astaxanthin Market-Sources, Technologies and Applications (2018), el consumo de astaxantina procedente de *H. pluvialis* fue de cerca de 54.8% del total producido, lo que hace estimar que para el año 2024 se podría alcanzar una producción de aproximadamente 190 toneladas métricas por lo que se serán necesarios nuevos

sistemas o métodos de producción para intensificar la producción de biomasa microalgal y poner obtener pigmentos de origen natural.

Existen diferentes tipos de sistemas de producción de microalgas que ayudan a alcanzar grandes cantidades de biomasa microalgal (sistemas abiertos y cerrados), cada uno de ellos tiene que ser adecuado a los requerimientos fisiológicos de la especie a cultivar y la pureza o axenidad que sea requerida en el producto final, así mismo que permita aumentar la sustancia a extraer (Posten, 2009), sin embargo el sistema de producción junto con el medio de cultivo comercial representan la mayor inversión para la producción de biomasa microalgal y sus derivados, es por ello que dificultan la producción a gran escala de microalgas, por lo que es necesario buscar una fuente de nutrientes alterna a la comercial (Ashraf *et al.*, 2011). Una de las principales oportunidades está en el sector agrícola en la rama de producción de hortalizas cultivadas bajo condiciones controladas (invernadero) como el Jitomate (*Lycopersicon esculentum*), ya que esta hortaliza necesita diferentes concentraciones de nutrientes a lo largo de sus etapas fenológicas durante su ciclo de vida, de las condiciones climáticas y principalmente durante la producción de frutos, el cual es abastecido en la mayoría con sistemas de inyección de soluciones nutritivas, que proporcionan la cantidad de fertilizantes necesarios y en muchas ocasiones excedidos para que la planta pueda tener la mayor productividad posible. En México la mayoría de los sistemas de riego que son utilizados para el cultivo de hortalizas bajo invernadero son abiertos, los cuales implican un mayor gasto de fertilizantes y agua, debido a que no hay un sistema de recirculación, por lo que existe un mayor riesgo de contaminación de tierras y cuerpos de agua, a diferencia de los sistemas cerrados, donde existe un sistema de recirculamiento del agua con nutrientes, hasta que los nutrientes son insuficientes para la producción (Sánchez *et al.*, 2007).

Los nutrientes restantes contenidos en el agua residual de la producción de hortalizas puede ser reutilizado para el cultivo de otros organismos acuáticos con menor exigencia de nutrientes (Abdel *et al.*, 2012) y un caso excepcional han sido

las microalgas, ya que puede suplir el rol de un medio de cultivo comercial, siempre y cuando contenga los nutrientes mínimos necesarios, es una buena oportunidad, poco costosa, disminuye la cantidad de sales minerales, lo que va de la mano a reducir la contaminación por exceso de sales en cuerpos de agua (Hammuda *et al.*, 1994), la oportunidad de disminuir los costos de producción en el cultivo de microalgas y sus derivados, ha permitido el desarrollo de nuevas fórmulas que sirven como medios de cultivo, con los cuales se puede tener una mayor producción en menor tiempo, como los fertilizantes agrícolas los cuales están compuestos principalmente de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), siendo estos los elementos más importantes para el cultivo de las microalgas, así como su combinación con medios de cultivo comerciales (Sipauba *et al.*, 2015).

La búsqueda de nuevas alternativas para la producción de alimento está teniendo auge en la actualidad, dentro de estas, se busca la modificación de métodos o metodologías que ayuden a la producción de alimentos un menor tiempo y más eficientes que los métodos tradicionales, algunas de las modificaciones pueden ser: ajustes a sistemas productores, donde la principal importancia radica en el costo beneficio que pueden llegar a tener (gastos en materiales y mantenimiento); la implementación de nuevos diseños o prototipos, los cuales tienen que ser factibles y eficaces para la producción (aumentar el rendimiento en la producción), además de ser sostenible para evitar o disminuir cualquier tipo de contaminación hacia el ambiente además de contar con un diseño que permita la reutilización y aprovechamiento de residuos resultantes de procesos de producción en distintos sectores.

Con respecto a la utilización de residuos para la producción de nuevos alimentos o productos, existe un vertiente dentro del sector de la agricultura, donde se ha propuesto utilizar los desechos de las plantas como hoja, tallos raíz y en algunas ocasiones algunos frutos para utilizarse como fertilizantes (Huang *et al.*, 2019), dentro de este mismo sector pero en la producción de hortalizas bajo invernadero existe una área de oportunidad, donde se pretende utilizar el agua residual que al

igual que otro tipo de agua proveniente de otro sector industrial pueden ser utilizadas para el cultivo de microalgas, ya que estas contienen nutrientes que necesitan las microalgas para crecer, por lo que se puede reemplazar el medio de cultivo comercial por el agua residual. En base a esto, el presente trabajo tiene por objetivo la producción de astaxantina mediante el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en agua residual de un invernadero hidropónico de alta tecnología productor de jitomate, donde se optimizaran las condiciones fisicoquímicas del agua residual, donde destacan principalmente los grupos de nitratos y fosfatos, además se realizaran pruebas de pH, temperatura y luz a los cultivos de microalgas, condiciones que permitirá su crecimiento para el establecimiento de su cultivo continuo y la obtención el pigmento carotenoide astaxantina.

II. Antecedentes

2.1 Microalgas

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos autótrofos que aprovechan la luz solar para convertir la energía lumínica en energía química, energía que utilizan para su desarrollo y que es generada mediante el proceso de la fotosíntesis (Gómez, 2007). Dichos microorganismos necesitan agua, luz, dióxido de carbono y nutrientes (principalmente fosfatos y nitratos) para poder ser cultivados y así obtener distintos compuestos de acuerdo a la especie y a su composición celular (Zullaikah *et al.*, 2019), algunas contienen elevados porcentajes de proteína y grasas, lo cual las hace más atractivas para la industria de alimentos, otras se caracterizan por contener altos niveles de metabolitos secundarios los cuales son utilizados en la industria de la cosmética y/o nutracéutica como antioxidantes (Rendón *et al.*, 2015), y de estos los componentes que más destacan son; carbohidratos (Piña *et al.*, 2011), proteínas (Pietryczuk *et al.*, 2014), aminoácidos (Hempel *et al.*, 2012), así como algunos compuestos bioactivos para su uso farmacéutico o nutracéutico (Jacob *et al.*, 2015), y una gran diversidad de pigmentos naturales contenidos en sus estructuras celulares, dentro de los más reconocidos son las clorofilas de tipo a, b y c, beta-carotenos, astaxantina, xantofila y ficobiliproteínas (Begun *et al.*, 2015).

2.2 Pigmentos

Los pigmentos son parte de la composición de las microalgas, los cuales son producidos de forma natural o durante un estrés en su ciclo de vida debido al ambiente donde se desarrollan, algunos de los grupos de estos pigmentos son las clorofilas y los carotenos (Brito *et al.*, 2016). Estos pigmentos pueden estar presentes en diferente composición en las microalgas y algunas cianobacterias, por lo que las fuentes para la obtención de pigmentos más utilizados son la ficocianina obtenida de *Arthrospira* spp., (antes *Spirulina* sp) para la elaboración de alimentos para consumo humano que da tonalidades de verde a azules (Forbes *et al.*, 2017),

beta-caroteno obtenida de *Dunaliella* sp con tonalidades amarillo-naranja (Ibáñez y Calderón, 2005) y astaxantina un caroteno que es principalmente obtenido de *Haematococcus pluvialis* ya que existen otros microorganismos de los cuales se puede obtener dicho pigmento que brinda tonalidades rojizas (Shah *et al.*, 2016).

Los carotenoides son colorantes polienicos rojos y amarillos, su estructura molecular posee un grupo cromóforo de dobles enlaces conjugados en una cadena alifática ramificada (grupo metilos), formada por ocho restos de isopreno, por lo tanto, dichos pigmentos son tetraterpenoides con uno o dos ciclos y algunos son lineales. Estos son derivados oxigenados de cuatro hidrocarburos fundamentales llamados genéricamente carotenos, los carotenoides resultan de sustituir, en los carotenos algunos de los hidrógenos por grupos oxhidrilo, carbonilo, epóxido o carboxilo. Por lo tanto, los carotenoides son derivados de los carotenos-licopeno, alfa-caroteno, beta-caroteno y γ - caroteno (Yufera, 1995).

1.3 *H. pluvialis* como fuente productora del carotenoide astaxantina

Haematococcus pluvialis Flotow es una microalga unicelular fotosintética de agua dulce con forma ovoide hasta circular, biflagelada y móvil en su estado vegetativo, perteneciente a la familia Haematococcaceae y al género *Haematococcus*, que se encuentran en distintos hábitats acuáticos alrededor del mundo (Algabase, 2018). Esta microalga es una de las más conocidas dentro de las Chlorophytas (algas verdes), debido a que se considera como la principal fuente natural para la extracción de un tipo de pigmento de clase carotenoide que recibe el nombre de astaxantina, el cual puede ser hasta el 4% de su peso seco total de la microalga (Boussiba *et al.*, 1999), siendo esta la mayor concentración conocida del pigmento en la microalga, la cual está por encima de la levadura *Phaffia rhodozyma* (Begum *et al.*, 2015), que al igual que la microalga también se utiliza para la extracción de pigmento. Por lo tanto, *H. pluvialis* es la fuente natural de pigmento más utilizada para la elaboración de alimentos para peces, especialmente salmónidos (Choubert

y Heinrich, 1993), así como su uso en la industria farmacéutica donde es utilizada como antioxidante (Naguib, 2000).

1.4 Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihydroxy-B, B-caroteno-4,4'-diona) es un carotenoide sintetizado por varios organismos acuícolas, entre los más destacados se encuentra la microalga *H. pluvialis* y la levadura *Phaffia rhodozyma*, siendo estos los responsables de la coloración de algunos organismos acuáticos como crustáceos, moluscos y salmónidos, y algunas aves como el flamenco (Abalde *et al.*, 1999). La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' sobre los dos anillos bencénicos al final de la molécula. Diferentes enantiómeros de la molécula son resultantes de la unión de los grupos hidroxilo a los átomos de carbono, que son centros de asimetría. Cuando los grupos hidroxilo se unen sobre el plano de la molécula se dice que están en configuración R y cuando los grupos hidroxilo se unen bajo el plano de la molécula se dice que están en la configuración S. De esta manera hay tres posibles enantiómeros: R, R', S, S' Y R, S' (meso) (Amos, 2005).

1.5 Síntesis de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*

La síntesis del pigmento astaxantina en la microalga *H. pluvialis* comienza cuando existen distintos factores ambientales y condiciones fisicoquímicas del agua que causan un estrés en la fisiología de la célula, siendo esta la respuesta ante la protección contra el estrés oxidativo, el grado de estrés va depender del tiempo de exposición y la intensidad, algunos de los más estudiados han sido: la cantidad de sales disueltas en el agua, tipo e intensidad de luz que recibe durante el día, la temperatura, el nivel de CO₂ y por ultimo pero no menos importante la concentración de nitrógeno y fosforo, todos estos dependen del sitio donde se encuentre la microalga o donde se estableció el cultivo, siendo estos algunos de los factores más estudiados para la síntesis de astaxantina (Domínguez *et al.*, 2004).

Como la astaxantina pertenece al grupo de los carotenoides, el primer paso para la síntesis de un caroteno es la condensación de dos moléculas de difosfato de geranilgeranilo ó geranil-geranil difosfato (GGPP) para formar fitoeno, modificado por la enzima fitoeno sintasa, aquí es donde es el comienzo del carotenoide astaxantina, después se llevan a cabo las reacciones de desaturación que conducen a la síntesis de licopeno, seguido de dos reacciones de ciclación para la síntesis de β -caroteno. La formación de astaxantina proviene del β -caroteno donde intervienen dos enzimas β -caroteno cetolasa y carotenoide hidroxilasa (Figura 1) (Steinbrenner *et al.*, 2001).

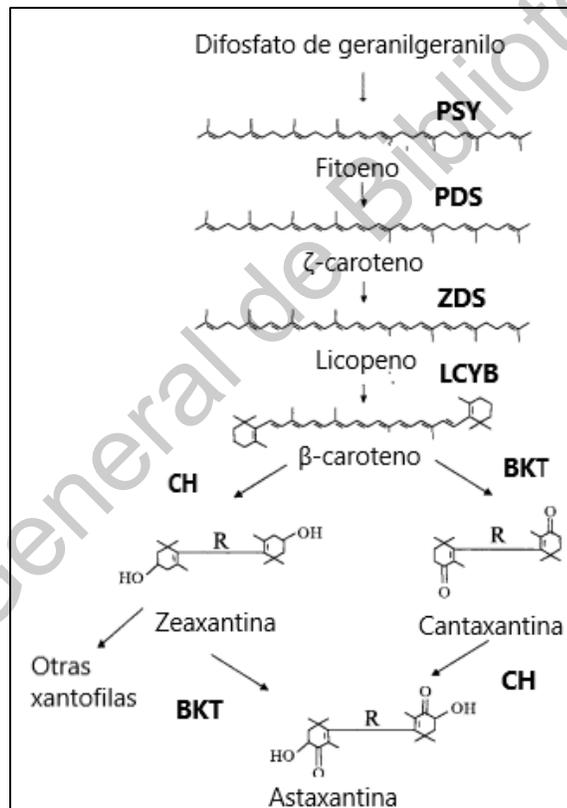


Figura 1: Ruta biosintética de astaxantina en *H. pluvialis*. Fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), z-caroteno desaturasa (ZDS), licopeno ciclasa (LCYB), β -caroteno ketolasa y carotenoide hidroxilasa (CH). Traducido y redibujado de Steinbrenner *et al.*, 2001.

1.6 Sistemas productores de microalgas

El sistema de producción de microalgas es complejo y multifase donde se aprovecha la luz solar mediante las microalgas para la producción o generación de compuestos de interés, en estos sistemas se calcula el volumen a contener, la dinámica de fluidos así como la transferencia de luz, ya que para que exista una mayor productividad, el fotobiorreactor tiene que operarse en condiciones de iluminación luz-oscuridad con la superficie de volumen y con suficiente transferencia de masa gaseosa a través del cultivo (Burgess *et al.*, 2011).

Los sistemas pueden ser de dos tipos, aquellos que se conocen como sistemas abiertos (Raceway Pond); los cuales tienen contacto con el medio ambiente de la zona, por lo que el cultivo va acorde a las condiciones de la ubicación, además este puede ser un cultivo mixto, ya que al no contar con un sistema aislado, puede crecer cualquier microalga u otros microorganismos que no afecten su crecimiento entre sí, y existen aquellos que no dependen en su totalidad de las condiciones ambientales y climáticas del entorno, conocidos como fotobiorreactores y/o sistemas cerrados. Los costos de los sistemas cerrados puede ir de 3 a 10 veces más que los sistemas abiertos, de esta manera el cultivo de microalgas en fotobiorreactores debe ser cuando el producto a obtener tiene un alto valor económico en el mercado (Hors, 2009), además en este tipo de sistemas se puede obtener un mayor rendimiento y pureza del producto a obtener, evitando en este y en la mayoría de los casos una contaminación por otros microorganismos, por ejemplo el caso de *Physoderma sedebokerense*, hongo causa grandes pérdidas en la producción de astaxantina, ya que es considerado un patógeno para *H. pluvialis* (Strittmatter *et al.*, 2016), es por ello que dichos sistemas están diseñados y elaborados en tubo de PVC transparente o cristal, esto en conjunto con buenas prácticas de manejo se pueden controlar las condiciones de cultivo y se pueden obtener productos de alta calidad (Montes *et al.*, 2014).

1.7 Estimación costo de producción de astaxantina

En la actualidad la producción de astaxantina a partir de microalgas puede ser más costosa que producirla sintéticamente, sin embargo, se pueden reducir costos cuando se utiliza buena tecnología y una producción a gran escala, se estima que para producir un kilogramo de la biomasa de astaxantina y microalgas puede ser tan bajo como \$ 718 / kg y \$ 18 / kg respectivamente (Li *et al.*, 2011). Zhang *et al.*, (2009) reportan que la producción de astaxantina en sistemas abiertos, puede ser una buena alternativa, ya que la concentración de astaxantina que obtuvieron de un cultivo mantenido durante 12 días fue de 2.5 y 2.79%, dicho valor está por debajo de aquellos que se producen en sistemas cerrados, sin embargo, aún sigue siendo una de las concentraciones más elevadas entre los organismos de los que se obtiene la astaxantina.

1.8 Métodos para la producción y obtención de astaxantina de la microalga *H. pluvialis*

Durante décadas se han llevado a cabo varios estudios donde se somete la microalga a distintas condiciones fisicoquímicas del medio donde crece, esto con el fin de aumentar la concentración de la astaxantina, a continuación, se detallan algunos de los trabajos realizados con esta microalga, así como el método para aumentar la concentración de biomasa o astaxantina de *H. pluvialis*.

1.8.1 Luz

La estimulación de genes que intervienen en la ruta de síntesis de la astaxantina es una de las aplicaciones nuevas, dicho proceso consta de desencadenar la expresión de genes responsables de la síntesis de astaxantina mediante luz a diferente longitud de onda y de distinto color, como la luz blanca y azul, ya que se propone como una herramienta para la obtención de astaxantina en menor tiempo (Ma *et al.*, 2018).

Es un experimento llevado a cabo por Park *et al.*, (2001) demostraron que la intensidad de la luz es importante para la cinética de crecimiento y para la acumulación de astaxantina, ellos trabajaron con *H. pluvialis* cultivada en medio de cultivo Peptona-proteasa, un pH ajustado a 6.4, temperatura de 20 °C en agitación constante e iluminación con lámpara de luz blanca fluorescente a una intensidad de 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Las intensidades de luz utilizadas fueron; condiciones de oscuridad, 15, 30, 60, 75, 90 y 160 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y el tiempo de exposición fue de 400 horas, así como una suplementación con 470 (luz azul) y 680 nm (luz roja) fotones de LEDs. Sus resultados demuestran que a una intensidad de 75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ es la mejor intensidad para la acumulación de biomas microalgal, en contraste con 15 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ en la que se obtuvo menos de 1.0 g/L siendo esta la concentración de biomasa más baja, solo por encima del tratamiento de oscuridad, la cual alcanzo cerca de 0.5 g/L., en el caso de la concentración de astaxantina, la mayor concentración se obtuvo con el tratamiento de 160 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, alcanzando una concentración de 6.5 mg/L a las 300 horas de exposición, en contraste con el tratamiento de 15 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y de oscuridad, los cuales presentaron la concentración más baja, siendo esta 10 veces menor. La suplementación de la luz azul y roja también tuvo un efecto en la cinética de crecimiento como en la acumulación de la astaxantina, ya que se demostró que la luz azul y luz roja puede estimular el crecimiento de la microalga, ya que el tratamiento de luz fluorescente tuvo la tasa de crecimiento más baja, siendo de la luz azul de donde se obtuvo la mayor concentración de astaxantina, siendo 1.6 – 2.4 veces más que cuando no se suplemento la microalga con luz adicional, lo mismo ocurrió con la luz roja de donde se obtuvo de 1.3-1.5 veces más que cuando no se suplemento el cultivo.

Se ha demostrado que *H. pluvialis* responde de distinta forma a la cantidad y tipo de luz, un estudio elaborado en el 2004 por Katsuda *et al.*, desmostaron la oscilación de producción de astaxantina cuando la microalga se somete a distintos tipos de luz, ellos trabajaron con la cepa NIES 144, en medio de cultivo Basal de Kobayashi a un pH de 6.8 a 20 °C, el tipo de luz y la intensidad fueron a 2.8, 8.0 y 12.0 $\mu\text{mol}/$

m²/s con un panel de luz LED roja, verde, azul-morado o morado y una lámpara de luz fluorescente, con un periodo de 300 horas para cada uno de los experimento. los resultados demuestran que se obtiene una mayor concentración de biomasa cuando se utiliza una luz azul-morado, ya que se alcanzó una concentración de 0.546 mg/cm³ mientras que la concentración más baja se encontró en la luz verde con 0.178 mg/cm³, sin embargo, no se pudo cuantificar la astaxantina en dos tipos de luz; azul-morado y verde, por otro lado, la luz azul presentó la mayor concentración con 14.0 µg/cm³, mientras que la concentración más baja fue para la luz blanca con 3.1 µg/cm³.

Se ha demostrado en un estudio científico elaborado por Ki *et al.*, 2006, que no es necesario someter los cultivos de *H. pluvialis* a fotoperiodos intensos de iluminación, ya que es un gasto innecesario de energía, esto después de que se elaboró un experimento en donde se sometieron los cultivos a una intensidad de luz fluorescente continua de 220.6 µE/m²/s, otro cultivo con la misma intensidad de luz suplementado con pulsos de luz y el último fue con pulsos de luz con una intensidad de 65.6 µE/m²/s, los pulsos de luz tuvieron una duración de 13.66 y 272.9 milisegundos encendido-apagado respectivamente. Los resultados demuestran que en los tres tratamientos la concentración celular disminuyó entre los 3 y 7 días después de su inoculación, mientras que la concentración de astaxantina aumentó respecto al paso del tiempo (30 días) de exposición a la luz quedando de la siguiente manera; luz fluorescente continua a 220.6 µE/m²/s se obtuvo la cantidad de 431 mg mL⁻¹, 466 mg mL⁻¹ para el tratamiento de luz continua con pulsos de luz, siendo este el mejor tratamiento para la producción de astaxantina y por último 241 mg mL⁻¹ siendo la concentración más baja que se obtuvo del tratamiento de pulsos de luz a 65.6 µE/m²/s. A partir de estos resultados se llevó a cabo un segundo experimento donde se ajustó la luz quedando los tres tratamientos de la siguiente manera; 316.4 µE/m²/s de luz fluorescente continua, el segundo estuvo expuesto a la misma intensidad de luz que el primer tratamiento más pulsos de luz a una intensidad de 316.4 µE/m²/s, mientras que el último tratamiento solo tuvo pulsos de luz al interior

del cultivo a un intensidad de $16.4 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. los resultados de este segundo experimento demuestran que la intensidad de luz fue demasiado, pues el patrón de crecimiento celular se conserva, ya que a partir del día 5 la concentración celular comienza a disminuir en el tercer tratamiento el cual solo es pulsos de luz, a diferencia de los dos tratamientos restantes, donde la concentración de biomasa microalgal aumento en los primeros 3 días y comenzó a decrecer a partir del día 5. En cuanto a la concentración de astaxantina, el mejor tratamiento para la síntesis de astaxantina fue el de luz fluorescente externa y pulsos de luz internos con $334 \text{ mg}/\text{mL}$, seguido de luz fluorescente continua con $274 \text{ mg}/\text{mL}$ y por último la menor concentración fue de $99 \text{ mg}/\text{mL}$ para el tratamiento de pulsos de luz interna.

Para el año 2012 un estudio elaborado por Nagaraja *et al.* (2012), sugiere que la microalga *H. pluvialis* responde de diferente manera a las intensidades de luz, en dicho experimento se utilizaron las siguientes intensidades 2, 4, 10, 20, 30 (control) y $40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, siendo estas unas de las intensidades más bajas en trabajos de investigación acerca de la luz como factor estresante, los resultados demuestran que la falta de luz en un cultivo celular puede afectar la cantidad de pigmentos, ya sea como accesorios para la fotosíntesis como es el caso de las clorofilas, las cuales se concentraron en mayor medida cuando se expuso el cultivo a $40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, siendo un 20% más concentrado que el control, al igual que los carotenoides totales con una concentración final máxima de $73.57 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Wong *et al.*, 2016 llevaron a cabo un experimento con la cepa de la microalga *H. pluvialis* UTEX#2505, la cual se mantuvo a una temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, la luz provista fue luz blanca fría de tecnología led durante el periodo de experimento, para ver la influencia de la luz sobre la cinética de crecimiento de la microalga, se trabajaron con dos fotoperiodos; el primero fue de 24:0 luz- oscuridad y el segundo fue de 12:12 luz- oscuridad, la iluminación utilizada fue luz blanca, luz roja y azul, utilizando una intensidad de luz inicial de $40.06 \pm 3.05 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Los resultados demuestran que el mejor fotoperiodo para el crecimiento vegetativo de la microalga es de 24:0 luz-oscuridad, seguido de luz roja y por último la luz azul, dicho orden se

mantuvo para el fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad. Para la síntesis de astaxantina se cosecho la microalga a los 12 días en la fase de crecimiento y fue transferida a un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno y elevada intensidad lumínica de $170 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, con los dos fotoperiodos y los 3 tipos de luz mencionados anteriormente, esto por un periodo de tres días. Los resultados desmesuran que la mayor concentración de astaxantina en el fotoperiodo de 24:0 luz-oscuridad, fue con la luz blanca obteniendo un contenido del 4.575%, mientras que la menor concentración se encontró con la luz roja con tan solo 2.830%, que dando en intermedio la luz azul con una concentración del 5.513%.

Otro experimento con luz fue utilizado para la producción *H. pluvialis* por Sun *et al.*, 2017, el cual consistió en aumentar la concentración de biomasa para después dar un estrés y de esta manera obtener un mayor rendimiento de astaxantina, ellos utilizaron la cepa FACHB-712, cultivada a una temperatura de 22 °C, a pH de 6.5 y con una intensidad de luz de $50 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ mezclando luz roja y luz blanca cuando la concentración celular era baja para evitar foto inhibición, con un fotoperiodo de 12:12 oscuridad luz, ajustando la emisión de luz al día 5 a $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. En dicho experimento el mejor tratamiento para reproducción de la microalga, fue la mezcla de luz 2:1 roja-blanca respectivamente, ya que representó un incremento cerca del 50% que cuando se expuso solo a luz blanca, ya que a partir del día 5 se cambió la intensidad de luz durante la fase de crecimiento, factor que ayudo a obtener la mayor concentración del experimento, esta fue de 0.161 g/L.

1.8.2 pH

El pH es uno de los factores químicos más importantes del medio de cultivo donde se crecen las microalgas a nivel laboratorio, y esto va de acuerdo al método y tipo de medio de cultivo a utilizar, sin embargo, la oscilación de este puede ir de 6.4 a 7.5, de acuerdo a reportado en artículos científicos.

Hata *et al.*, (2001) utilizaron la cepa NIES-144 cultivada en medio basal ajustado a un pH de 7.5, 25 °C con una intensidad de luz de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. De acuerdo a la

escala de pH se utilizaron los siguientes valores para el experimento; 5, 6, 7, 8, 9 y 10, los cuales no fueron controlados durante la cultivación de la microalga, excepto el pH de 10, al cual se le agregaron unas gotas de NaOH 5N para mantenerlo entre 9.8-10.2. los resultados muestran que no fue detectable el crecimiento celular a un pH de 5.23, mientras que el crecimiento celular fue muy bajo a un pH de 6.14, en contraste con la máxima velocidad de crecimiento que se obtuvo del pH DE 7.85. para los cultivos de pH inicial de 9.15 y 10.05, el pH decreció durante el cultivo de la microalga, aunado a que la tasa de crecimiento dela microalga disminuyo en un en un 50% a lo obtenido a un pH de 7.85, además, cuando se mantuvo el pH A 9.8-10.2 el crecimiento celular fue altamente inhibido.

En el año 2007 Dong *et al.*, menciona que la microalga puede adaptarse a diferentes valores de pH esto después de que, en un experimento elaborado por su equipo, demostraron que la microalga sobrevive a pH de 6, 7, 8 y 9, sin embargo, los mejores resultados los obtuvieron cuando la microalga se expuso a un medio de cultivo alcalino con un valor de pH 8.

Para el año 2012 Nagaraja *et al.*, elaboraron un experimento donde se evaluaron distintos factores fisicoquímicos para la producción de astaxantina, el pH fue uno de esos factores a evaluar. En el experimento utilizaron los siguientes valores en escala de pH; 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 (como control), 7.0, 7.5 y 8 (todos los valores de pH fueron al inicio del experimento), temperatura de 25 ± 1 °C, en medio de cultivo Basal de Bold modificado y expuestos una intensidad de luz de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, con un fotoperiodo de 12:12 hora luz-oscuridad. Los resultados demuestran que la microalga sobrevivió en todos los valores de pH, siendo el valor de 7.0 de donde se obtuvo la mayor concentración y crecimiento microalgal siendo cerca del 5% sobre el control (pH 6.0), además presento la mayor concentración de carotenoides ($68.51 \mu\text{g}/\text{mL}$).

El pH tiene un rol importante para el crecimiento de la microalga, y este además evita el crecimiento de patógenos que afectan la producción de la microalga y por

lo tanto la concentración de astaxantina, es por ello que, un estudio elaborado por Hwang *et al.*, 2019, utilizaron PH distintos en la inoculación de los cultivos, los cuales fueron infectados por el hongo *Paraphysoderma sedebokerensis* y de esta manera evaluar el doble efecto que tiene el PH, en este doble efecto se evaluó el nivel de infección por el hongo y la cantidad de astaxantina producida en cada uno de los experimentos. En este caso se utilizó la cepa NIES-144, a pH de 7.5, temperatura de 23 °C, con una intensidad de luz de 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para el crecimiento vegetativo, mientras que para la producción de astaxantina se utilizó un medio de cultivo con carencia de nitrógeno y una intensidad de luz de 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Para ver el efecto del pH en el crecimiento de la microalga, el nivel de infección y la producción de astaxantina se ajustó el pH DE 3 A 9 en intervalos de 1 (7.5 como control), y estos fueron ajustados con HCL o KOH, dependiendo de la situación. Se encontró que los pH de 7 a 9 fueron más susceptibles a la infección por el hongo, mientras que los cultivos a pH de 3 o 4 no fueron infectados, mientras que a 5 y 6 presentaron una infección lenta. Para la producción de biomasa y astaxantina se monitoreo el cultivo en condiciones de contaminación con el hongo, dichos cultivos tenían un pH de 4 y 7.5, en este último se tuvo una disminución en la concentración celular a partir del día 4, y finalmente para el día 12 el cultivo tenía un 100% de infección. Por otro lado, el cultivo a pH 4 creció sin ninguna infección, siendo este muy similar a un cultivo en condiciones axénicas. Al final del cultivo en fase de crecimiento, se reemplazó el medio de cultivo con uno nuevo el cual carecía de nitrógeno, la intensidad de la luz se cambió a 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, esto para inducir la síntesis de astaxantina mediante el estrés oxidativo, los resultados obtenidos demostraron que, para el cultivo de pH 7.5 se logró obtener la cantidad de 0.6 mg/L de astaxantina, esto se debió a la infección que logro el hongo sobre el cultivo, sin embargo, para el cultivo con pH 4 los resultados fueron más favorables, ya que se alcanzó la cantidad de 41.4 mg/L de astaxantina, esto en ausencia de hongo, lo que probablemente causo la gran acumulación de astaxantina fue el medio de cultivo acido. Por otro lado, otros resultados obtenidos de cultivos infectados por el hongo, alta intensidad de luz y carencia de nitrógeno en el medio de cultivo, se logró la

obtención de 84.8 mg/L de astaxantina, por lo que dicha conclusión es que, el uso combinatorio de elementos como carencia de nitrógeno en medio de cultivo cuando ha pasado la fase de crecimiento, un aumento gradual de la luz para evitar la foto inhibición y un estrés por la acidez del cultivo, es un buen método para la producción de astaxantina, aun en presencia del hongo.

1.8.3 Temperatura

Algunos de los trabajos con la microalga *H. pluvialis* han sugerido que la temperatura óptima para obtener un mejor rendimiento de biomasa es a los 25 °C, esto basado en un experimento elaborado por Hata *et al* (2001), donde se evaluaron las siguientes temperaturas en la cepa NIES-144: 16, 20, 22, 25, 28, 30 y 33 °C, en donde se establece que la mejor temperatura fue entre los 22 °C y 25 °C, ya que estos valores no tuvieron diferencia significativa, por el contrario la peor temperatura para el cultivo de la microalga fue a los 16 y 33 °C, y un características importante en este experimento, es que, a temperaturas inferiores a 25 °C las células se mantuvieron en estado vegetativo, mientras que el enquistamiento de la célula, se observó a partir de los 28 °C.

Se han elaborado distintos experimentos en donde se someten los cultivos de la microalga a distintas temperaturas, tal fue el caso de Dong *et al.*, (2007), quien propone in intervalo de crecimiento de la microalga que va desde los 20 °C a loa 24 °C, ya que por debajo de los 20 °C y/o por encima de los 24 °C, el crecimiento de la microalga se detiene y puede influir en el rendimiento de astaxantina. Es por ello que la producción de astaxantina se han centrado en la modificación de las condiciones de cultivo, en este caso de trata de la oscilación de la temperatura en los cultivos de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina, algunos de los trabajos enfocados en esta condición son los siguientes:

Giannelli *et al.*, 2014, trabajo con la cepa NIES-144 mantenida en medio de cultivo basal Kaboyashi a una temperatura de 20 °C, con una intensidad de iluminación de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ mediante un bulbo de luz fluorescente fría, la temperaturas utilizadas

fueron: 20, 23.5, 27 y 30.5 °C. los resultados muestran que para esta cepa, la temperatura de 30.5 fue la más efectiva para su crecimiento, ya que fue la que presentó mayor concentración de biomasa, siendo casi un 35% mayor que a una temperatura de 20 °C. Sin embargo, se menciona que la temperatura adecuada para la cepa ha sido de 20 °C, pero esto puede depender de la zona de donde se aisló la cepa utilizada, ya que ellos mencionan que en otros trabajos dicha cepa ha crecido bajo condiciones de temperatura de 23.5 y 27 °C e incluso a los 28 °C, sin mostrar efectos negativos en su crecimiento. Para llevar a cabo el experimento de la astaxantina se utilizaron dos temperaturas; 20 y 27 °C, las cuales a los 7 u 8 días después de la inoculación difirieron en la concentración de astaxantina, siendo la temperatura de 27 °C quien obtuvo la mayor concentración siendo 156 mg/L contra los 115 mg/L de la temperatura de 20 °C, por lo que se concluyó que para la producción de astaxantina en esta cepa, la temperatura ideal podría estar alrededor de los 27 °C, sin embargo habría que sumar el estrés nutricional a la cual fue sometida la microalga durante este experimento.

Wan *et al.*, (2014) midieron el efecto que tiene la temperatura en los cultivos de la microalga tanto en la producción de biomasa que es el estado vegetativo y el estado de estrés, estado de donde se obtiene la astaxantina, la cepa utilizada fue ZY-18, el pH se mantuvo a 7.5-8 y la temperatura fue de 8, 13, 18, 23, 28 y 33 °C, con una intensidad de luz continua de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, por otro lado, los efectos de la temperatura en condiciones de laboratorio fueron bajo el siguiente método, cuando se llegó a una concentración de 10g/L de microalga, se transfirió a un medio de cultivo NIES-N, la intensidad de la luz fue de 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ aunado a un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad, las temperaturas fueron establecidas de dos maneras, el primero fue variado durante el día de 8 °C a 33 °C, mientras que por la noche se mantuvo a 28 °C, el segundo fue al contrario del primero, la temperatura del día se mantuvo, mientras que la nocturna de vario. En este experimento los mejores resultados para la concentración de biomasa, se obtuvieron cuando los cultivos se sometían a 28 °C, seguido de los 23 °C con iluminación continua, el efecto que tuvo

la temperatura sobre la biomasa fue similar para la concentración de astaxantina, ya que a un temperatura de 33 °C, la células murieron o estaban en proceso, por lo que para esta cepa no es recomendable someter a 33 °C los cultivos, esto debido a que el intervalo de temperatura ya ha sido reportado siendo de 20 °C a 28 °C. La cantidad de biomasa producida en 12 días fue de 0.12 g/L/d, mientras que para astaxantina fue de 5.4 mg/L/d a una temperatura de 28 °C. para la variación de temperatura los mejores resultados se obtuvieron a los 28 °C, ya sea para la producción de biomasa o astaxantina, mientras que los valores de contracción más bajo se obtuvieron a los 8 °C, por lo tanto, es este estudio se establece que la mejor temperatura la obtención de astaxantina es de 28°C.

De acuerdo a lo anterior mencionado, existe un estudio de Hong *et al.*, (2015), quien afirma que, por encima de los 28 °C, la ineficiencia en la producción de astaxantina en *H. pluvialis* en visible, ya que, en su estudio con la cepa NIES-144, estudió el efecto que ésta tiene en los dos estados de la microalga; en el estado vegetativo la microalga se mantuvo en medio de cultivo NIES, pH 7.5m intensidad de luz de 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad. Para el segundo estado (estrés) se transfirieron los cultivos a medio de cultivo NIES con carencia de nitrógeno, al mismo pH y fotoperiodo, solo la intensidad de luz aumento a 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, las temperaturas utilizadas fueron 23 °C (temperatura de cultivo), 30 y 36 °C. La concentración de biomasa en los cultivos a 30 y 36 °C fueron reducidos en un 20 y 48% respectivamente, comparado con la temperatura control (1.21 g/L), por otro lado, la mayor concentración de carotenoides fue obtenida a los 23 °C (5.945 ± 0.124 mg/g peso seco), seguida de los 30 °C (4.365 ± 0.141 mg/g peso seco) y por último y a los 36 °C (3.586 ± 0.150 mg/g peso seco).

1.8.4 Fuente de carbono CO₂

La inyección de CO₂ es otra alternativa para la producción de astaxantina, ya que se busca maximizar la fijación del carbono mediante la fotosíntesis, de la cual se obtiene biomasa, sin embargo se ha demostrado que la inyección del 5% (v/v) al

cultivo beneficia su fijación y por lo tanto su crecimiento es mayor en la fase de crecimiento, pero concentraciones arriba del 10% provoca un estrés durante la fase de crecimiento, por lo que la acumulación de biomasa se ve afectada, por lo que dichas concentraciones no son necesarias sino hasta la fase estacionaria donde la concentración de microalga permite una mayor fijación del CO₂ (Christian *et al.*, 2018).

1.8.5 Fosforo y nitrato

Los compuestos del fosforo son nutrientes para las plantas, los cuales también pueden ser utilizados por otros organismos vegetales acuáticos, como el caso de las microalgas, éstas necesitan de 1g de este compuesto para generar alrededor de 150g de biomasa microalgal, siendo de esta forma una manera natural de eliminar los compuestos del fosforo de aguas con concentraciones elevadas (Pütz, 2008). Andrade *et al.*, (2009) evaluaron la capacidad de remoción de nitratos, fosfatos y materia orgánica de agua residuales, utilizando la microalga *Scenedesmus* sp., quienes reportaron una remoción del 99.44% para el nitrógeno amoniacal, para los fosfatos fue de un 77.54% y para la materia orgánica fue de un 35.59%, con base a esto se establece que las sustancias más consumida por las microalgas en un medio acuosos son los compuestos de nitrógeno y fosforo.

Wang *et al.*, (2013) establecieron que la concentración inicial para la inoculación de microalga y nitratos tiene cierta importancia en la producción de astaxantina, pues obtuvieron una concentración más baja que la reportada anteriormente por otros autores, la concentración fue del 3.8% de la composición de biomasa en peso seco, en un medio de cultivo con poco nitrógeno y con una inoculación inicial de microalga de 0.5-0.8 g/L,

1.8.6 Fitohormonas

Los trabajos relacionados con la producción de astaxantina han ido más allá de la modificación del medio acuoso donde crecen y desarrollan, otros trabajos agregan

sustancias químicas las cuales aumentan los costos a las producción lo que casi siempre no es conveniente o vuelve más complejo el proceso de producción, la melatonina se considera como fitohormona mensajera y puede activar genes para la síntesis de astaxantina, los resultados muestran que se aumentó en 2.36 veces la concentración cuando se le agregaron 10 μM de dicha sustancia (Ding *et al.*, 2018).

1.8.7 Electricidad

La dosificación de pequeñas descargas eléctricas en un medio de cultivo con luz continua a 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, a una temperatura de 25 °C, la aireación fue de 1 v/v por minuto, los tratamientos de intensidades de electricidad fueron a 0, 60, 100 y 120 mA, una vez al día, de este estudio se reportó una concentración de 27 mg/L de astaxantina (Kim *et al.*, 2018).

1.8.8 Expresión de genes

Wen *et al.*, (2015), adicionaron etanol al cultivo de *H. pluvialis* para aumentar a la producción de astaxantina, dicha producción podría llegar hasta los 11.21 mg/L por día, adicionando un 3% (v/v) de etanol, sin embargo, dicho tratamiento ayudo a la expresión de varios genes carotenogénicos, dichos genes *ipi-1* y *ipi-2* promovieron la síntesis de isoprenoides y el suministro de sustrato para la formación de carotenoides.

El ácido jasmónico también tiene efecto sobre la expresión de genes carotenogénicos, Gao *et al.*, (2013), aplico distintas dosis de ácido jasmónico donde se observó que se activan ciertos genes de acuerdo a la dosis aplicada, a 25 mg/L tuvo mayor efecto en la expresión transcripcional de *pds*, *crtR-B* y *lyc*, mientras que cuando se aplicaron 50 mg/L, la se tuvo mayor impacto transcripcional de *ipi-1*, *ipi-2*, *psy*, *crtR-B* y *crtO*. Por lo que la síntesis de astaxantina puede estar regulada por el incremento en *pds*, *crtR-B*, *lyc*, *bkt-2* y *crtO* a nivel transcripcional e *ipi-1* e *ipi-2* tanto a nivel transcripcional como postranscripcional.

1.9 Alternativa al medio de cultivo para *H. pluvialis*

El medio de cultivo es uno de los productos más costosos dentro de la producción, es por ello que investigaciones están buscando alternativas para sustituir a este, en dichos estudios se han tenido buenos resultados especialmente con especies de la clase Chlorophyceae, donde se han reportado concentraciones similares de sustancias de interés a cuando se cultiva en medios de cultivos comerciales, por lo que se está proponiendo usar el agua residual como medio de cultivo (Valenzuela *et al.*, 2005).

El agua residual es aquella cuyas características originales han sido modificadas por actividades humanas, y que por su calidad requieren un tratamiento previo a ser reusadas y vertidas a un cuerpo natural de agua (OEFA, 2014). En este sentido el agua residual de los invernaderos está clasificada, como agua residual de origen agrícola, ya que su composición ha cambiado y es utilizada como sustrato para el cultivo de jitomate en hidroponía, esta se compone principalmente de los siguientes compuestos: Macronutrientes (C, H, O, N, P, K, Ca, S y Mg) y Micronutrientes (Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo, Co y Cl) (Aguilar *et al.*, 2004). Composición que es similar a los medios de cultivos comerciales para el cultivo de microalgas, tanto salinas como dulceacuícolas, están elaborados a base de macro y micronutrientes, además de contener algunas vitaminas (Guillard, 1975).

Castillo *et al.*, (2017) evaluaron el efecto del medio de cultivo para la producción de biomasa y astaxantina en recipientes de 500 ml, con aireación e inyección de CO₂ controlada, los medios de cultivo fueron: RM, BBM y OHM, en donde el mejor resultado en cuanto a la concentración de la biomasa la obtuvo el medio de cultivo RM, con 7.55×10^5 células/ml y la mayor concentración de astaxantina fue en el medio RM.

Otros estudios han propuesto que la microalga se puede aclimatar a las aguas residuales domésticas, donde se han obtenido concentración de hasta 3.6 mg/L, lo cual está muy aproximado a lo reportado en medios de cultivo comercial (Sato *et*

al., 2015). Los residuos de industrias que se dedican a la fermentación de sustancias o materia prima con alto contenido de nutrientes (Macro y micronutrientes), por ejemplo, los residuos de una planta destiladora de bioetanol, es usada para el cultivo de *H. pluvialis* la cual se han reportado concentraciones de 4.37 g/L, la cual es una de las más altas concentraciones de microalgas cultivadas en agua residual (Haque *et al.*, 2017).

1.10 Usos y aplicaciones de *H. pluvialis*.

Existen estudios donde se utilizan microalgas para limpiar agua residual, que de acuerdo con el Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (2014), esta es definida como la modificación química del agua con sustancias químicas, la cual no puede ser utilizada para consumo humano y animales, a menos de que tenga un tratamiento previo, de esta manera se han obtenido resultados que proponen utilizar este tipo de agua para el cultivo de microalgas, donde se llevaría a cabo dos fines; el primero el cultivo de especies de microalgas del cual se pueden obtener subproductos y la limpieza del agua de sustancias contaminantes de cuerpos de agua (Hammouda *et al.*, 2015).

La elaboración de alimentos con pigmentos naturales puede tener desventajas frente a los grupos de pigmentos de origen sintético, sin embargo el uso desmedido de colorantes artificiales puede dañar la salud humana, una de las alternativas que se tiene para brindar más coloración a peces, es aumentar la dosis de pigmento natural que se adhiere al alimento comercial, esto debido a que la pigmentación es menor a las mezclas de origen sintético, ya que la retención de las astaxantina a partir de *H. pluvialis* es de 6.2 mg/kg contra 12.7 mg/kg de la mezcla de astaxantina y cantaxantina, aun y por separado estos dos pigmentos sintéticos dan más coloración con valores de 11.8 mg/kg para astaxantina y 10.1 para cantaxantina (Choubert y Heinrich., 1993).

Un estudio en el camarón *Litopenaeus vannameis*, fue alimentado con tres dietas, dos a base de la microalga y un control, donde los resultados demuestran que el

alimento elaborado con lectina de soya y *H. pluvialis*, mostraron una ganancia de peso con respecto al alimento control, lo que sugiere que la adición de la microalga en el alimento tiene un beneficio en las funciones fisiológicas del camarón. El contenido de astaxantina fue medido en dos partes del cuerpo del camarón; el músculo y exoesqueleto dando los siguientes resultados. Para el músculo fueron 3.2, 5.5 y 8.5 mg/kg para el control, *H. pluvialis* y lectina de soya/*H. pluvialis* respectivamente; para el exoesqueleto fue de 8.1, 12.1 y 23.3 mg/kg en el mismo orden mencionado anteriormente. Siendo la coloración rojiza el principal atributo para el consumidor, lo que sugiere que la suplementación de los alimentos con *H. pluvialis* trae beneficios para el comercio del camarón (Parisenti *et al.*, 2011).

Otro estudio busca el efecto que tiene *H. pluvialis* sobre la coloración del cangrejo *Eriocheir sinensis*, principalmente en el caparazón y el ovario, ya que esto lo hace más atractivo comercialmente, se elaboraron cuatro alimentos con las siguientes cantidades de la microalga 0.0, 0.2%, 0.4% y 0.6%, dichos resultados sugieren que una cantidad de 60mg/kg de alimento es la mejor opción para obtener una coloración rojiza en el caparazón y ovarios del cangrejo (Long *et al.*, 2017).

Dentro de las aplicaciones en la industria farmacéutica se han hecho estudios donde se demuestra que la astaxantina de origen natural es uno de los antioxidantes con mayor actividad captadora de radicales libres, además de ha demostrado que en conjunto con algunos ácidos omega-3, ayudan a la disminución de los efectos oxidativos para la célula (Saw *et al.*, 2013). Yoshihisa *et al.*, (2014), demuestran que la astaxantina puede ayudar a reducir la apoptosis por rayos ultravioleta, además de tener otros efectos como antiinflamatorio (Park *et al.*, 2001)

1.11 Método de extracción de astaxantina

Para obtener la astaxantina de las microalgas, se han utilizado distintos métodos para aumentar el rendimiento, como la extracción con mezclas de solventes orgánicos, ahora se puede hacer más eficiente la extracción cuando se mezcla CO₂ con etanol, ya que de acuerdo a Reyes *et al.*, (2014), la actividad antioxidante de la

astaxantina se mantiene, la extracción es de menor tiempo en comparación con las de solventes, y proponen que es una buena técnica para la extracción de compuestos de alto valor procedentes de microalgas.

Haque *et al.*, (2016) evaluaron dos vías para la obtención de astaxantina, en la primera se utilizó ultrasonificación seguida de una extracción por solventes (acetona, metanol y etanol) mientras que la segunda se utilizó ultrasonificación con un pretratamiento de sustancias que rompen las células (ácido acético, ácido cítrico, hidróxido de sodio y peróxido de hidrogeno), dicha microalga fue cultivada en agua residual de una planta destiladora de etanol a partir de maíz, donde los resultados demuestran que el mejor método para la obtención de astaxantina, es aquel donde se da un pre-tratamiento con las sustancias que rompen las células, sin embargo menciona que la extracción por ultrasonificación fue más efectiva en cuanto ahorro de tiempo y de gasto de químicos, sin embargo, para una aplicación a mayor escala tiene que analizarse financieramente ya que puede no ser viable por el consumo de energía.

III. Hipótesis

El uso del agua residual de invernadero de alta tecnología y la optimización de sus condiciones fisicoquímicas como la temperatura, pH y luz, nos permitirá cultivar y obtener una mayor cantidad de biomasa microalgal, de tal manera que se obtendrá una mayor concentración de astaxantina que cuando se usa un medio de cultivo comercial.

Dirección General de Bibliotecas UNO

IV. Objetivos

3.1 Objetivo general.

Optimizar el pH y temperatura del agua residual de invernadero para que se utilice como medio de cultivo, así como la cantidad y tipo de luz para la producción de astaxantina mediante la microalga *Haematococcus pluvialis*.

3.2 Objetivos particulares.

Aclimatación de la microalga a medio de cultivo agrícola similar al agua residual de invernadero

Optimizar pH, luz y temperatura para establecer cultivos de *H. pluvialis* en agua residual de invernadero.

Obtener la cinética de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en agua residual de invernadero.

Extracción y cuantificación del pigmento astaxantina de *H. pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero mediante HPLC.

V. Material y métodos

5.1. Limpieza área de trabajo (Campana de Flujo Laminar)

Para cada uno de los procesos de escalamiento, revisión y adición de medio de cultivo, se hizo limpieza de la campana de flujo laminar donde se utilizaron distintos detergentes y desinfectantes, los cuales se mencionan a continuación: como detergente Neutra-Clean y como desinfectante cloro al 4%, al siguiente uso se utilizó como detergente Alumi-Clean y como desinfectante Citrosan (2.5 mL/L) y un tercer desinfectante Titan (90 ppm) que se rotaba entre los anteriores para evitar la resistencia de microorganismos presentes, una vez limpia la campana de flujo laminar se introdujo todo el material ya estéril, se encendió la luz UV por media hora, esto para asegurar la axenidad del lugar de trabajo y del material.

5.2. Cepa axénica

La cepa axénica de la microalga *Haematococcus pluvialis* se obtuvo del Laboratorio de Microalgas, perteneciente al Laboratorio de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.3. Mantenimiento de la cepa.

La cepa se mantuvo en una cámara climática (Artificial Climate Chamber RTOP series) en un tubo de ensayo de 5 mL con medio de cultivo Basal-Bold al 1% con agua destilada estéril, temperatura constante de 23 °C ± 1, fotoperiodo con lámparas de luz blanca fría de 13:11 horas luz-oscuridad a un pH de 6.8.

Para la obtención del inóculo axénico para el experimento, se utilizó el método de siembra en placa de agar bacteriológico con medio de cultivo Basal-Bold, donde se tomaron 100 µL del vial y se distribuyeron de manera uniforme por todo el agar con un asa de Drigalski estéril, las placas inoculadas con microalgas se dejaron en las

mismas condiciones artificiales dentro de la cámara climática que los tubos de ensaye con cepa axénica.

5.4. Escalamiento de la microalga

Con un asa bacteriológica se hicieron tres raspados sobre la placa con microalga hasta lograr ver un cumulo de microalga en la punta del asa, este se colocó en un matraz (Kimax) estéril con capacidad volumétrica de 200 mL, el cual contenía 100 mL de medio de cultivo (Basal-Bold) al 1%, se tapó en con torunda de algodón cubierta con papel aluminio, y una liga de látex sujetando el papel aluminio al cuello del matraz para un sellado hermético. Estos matraces se colocaron en un agitador (marca Multipurpose Rotater Thermo-Scientific) dentro de la cámara climática, con una velocidad 4/17 durante 24 horas. Una vez que el medio de cultivo comenzó a adquirir una tonalidad verde claro, se observaron a microscopio (Leica ICC50 HD) para verificar su pureza. Durante estas revisiones bajo microscopio se agregó medio de cultivo que se perdió por la evaporación y la extracción muestras para revisión. Los escalamientos a 500 mL, 1 L, 2L, se hicieron en una proporción 1:1 (v/v) inoculo-medio de cultivo, los cuales se mantendrán en la cámara climática con revisiones periódicas para descartar contaminación con otro microorganismo.

5.5. Curva de calibración Peso Seco.

La elaboración de la curva de calibración fue basada en el método de Arredondo (2007), con algunas omisiones, principalmente en la solución de enjuague, utilizando solamente agua destilada, el método para la curva de calibración fue el siguiente:

- a) Los filtros (Glass microfiber microfilter, Whatman) con diámetro de 47mm fueron lavados con agua destilada, colocados en charolas de aluminio y prequemados en estufa (Felisa FE-292) a 84 °C por 24 horas, después se colocaron en el desecador durante 1.5 h y se pesaron en una balanza (Ohaus Pioneer) hasta que el peso se mantuviera constante.

- b) Se tomó un volumen conocido del cultivo de la microalga, dicho volumen se pasó a través de los filtros con peso conocido (homogenizar bien el cultivo de microalga, tratando de que no queden bio-películas).
- c) Se colocaron los filtros con microalga en una estufa a una temperatura de 85 °C por 24 horas (el tiempo de secado depende de distintos factores, la concentración de microalga, condiciones ambientales del lugar).
- d) Una vez que estuvieron totalmente deshidratados se colocaron en un desecador al vacío durante 1.5 horas.
- e) Los filtros se pesaron uno por uno en la balanza, cuando se registró el peso, se regresaron al desecador.
- f) Los filtros se regresaron a la estufa para repetir el paso anterior por dos días más, hasta que la lectura del peso de los filtros no cambio.

Para el cálculo del Peso Seco Total (PST), se obtuvo de mediante la siguiente formula:

$$PST (\mu\text{g/mL}) = [(PSFM) - PSF] / VF$$

Dónde:

PSFM: peso seco del filtro con muestra.

PSF: peso seco del filtro sin muestra.

VF: volumen de muestra filtrado.

4.6 Tasa de crecimiento (r)

La tasa de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en cada uno de los experimentos se midió con la siguiente expresión matemática de acuerdo con Wood *et al.*, (2005):

$$r = \text{Ln}\left(\frac{N_t}{N_0}\right) / \Delta t$$

Dónde:

N_0 = tamaño de la población al inicio de un intervalo de tiempo,

N_t = tamaño de la población al final de un intervalo de tiempo,

Δt = intervalo de tiempo ($t_t - t_0$) en días

4.7 Depuración y esterilización del agua residual de invernadero

El efluente del agua residual de invernadero paso a través de una tubería de acero inoxidable, hasta llegar a los depósitos metálicos con capacidad volumétrica de aproximadamente 100,000 litros, cuando se llenaron los tanques se esperó a que sedimentara la mayor parte de las partículas, y se inició el proceso de depuración y esterilización, esto fue mediante un sistema de micro-filtración compuesto por tanque hidroneumático, con capacidad volumétrica de 126L (Evans EQTHD126V), lámpara UV (Smart UV Sterilizer 02040) y un recipiente de microfiltración con capacidad de 165 litro por minuto (Hidronix Water Technology MHR-720-2). Después se envió agua a un contenedor de 10,000 litros y de aquí se tomó para llevar a cabo los experimentos.

4.8 Cuantificación de fosfatos y nitratos del agua residual de invernadero.

Se realizó la cuantificación de distintas variables del agua residual de invernadero como pH, nitratos y fosfatos antes de cada uno de los experimentos. El pH fue medido con un potenciómetro (HACH HQ40D), mientras que los nitratos y fosfatos se midieron mediante un método espectrofotométrico, con el equipo HACH DR6000. Dichos métodos corresponden a los números 8039, conocido como método de reducción de cadmio, donde el rango de saturación es de 0 a 30 mg/L, a una longitud de onda de 500 nm y 8084 para fosfatos, el cual se mide a una longitud de onda de 880 nm, con un intervalo de saturación permitida de 0.02 a 2.5 mg/L (Hach, 2000).

4.9 Preparación de medio de cultivo comercial y agrícola

4.9.1 Medio de cultivo comercial Basal de Bold

Se utilizaron los nutrientes necesarios para la elaboración del medio de cultivo comercial Basal-Bold (1942) con una pequeña modificación, esta fue la sustitución de un compuesto (tabla 1) en el laboratorio de microalgas, los macronutrientes y micronutrientes se prepararon por serado, por lo tanto, se obtuvieron 16 compuestos los cuales fueron preparados en frascos de cristal ámbar con capacidad volumétrica de 100mL y almacenados en refrigeración. Se utilizó 1 mL de cada solución por cada 1 litro de agua des ionizada para obtener el medio de cultivo Basal-Bold. En este medio de cultivo no fue necesario el ajuste de pH, pues cuando se colocan cada uno de los compuestos en el litro de agua des-ionizada, el pH final es de aproximadamente 6.6 – 6.8, el cual es el óptimo para la microalga en condiciones controladas y normal para el medio de cultivo.

Tabla 1: Composición de macro y micronutrientes del medio de cultivo Basal-Bold elaborado en el laboratorio de microalgas.

MACRONUTRIENTES			
COMPUESTO		g/L	PPM
Nitrato de sodio	NaNO ₃	250	84.9
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	25	147.02
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	75	246.47
Fosfato di potásico	K ₂ HPO ₄	75	174.18
Fosfato mono potásico	KH ₂ PO ₄	175	136.09
Cloruro de sodio	NaCl	25	58.44
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	1	98.08
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98	278.02
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11.42	61.83
Hidróxido de potasio	KOH	3.1	56.11
Sal sódica	Na ₂ EDTA (anhidro)	50	372.2
MICRONUTRIENTES			
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82	287.58
Cloruro de manganeso tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44	197.91
Oxido de molibdeno	MoO ₃	0.71	143.94
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57	159.6
Nitrato de cobalto hexahidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49	291.03

Nota: en la elaboración del medio de cultivo se sustituyó el compuesto Oxido de molibdeno (MoO₃), por Molibdato de sodio (Na₃MoO₄), la cantidad agregada por litro de este compuesto fue de 1g.

4.9.2 Medio de cultivo agrícola

Para aclimatar la microalga *H. pluvialis* al agua residual de invernadero, primero se formuló un medio de cultivo agrícola homologado al que se utiliza en el sistema de riego dentro del invernadero, este cuenta con todos los micro y macronutrientes que utilizan las plantas en las diferentes etapas fenológicas. El medio agrícola se separó en dos stocks, nitratos y quelatos y sulfatos, esto para evitar la formación de sales y precipitación de las mismas, reduciendo el nivel de nutrientes disponibles (tabla 2).

Tabla 2: Composición de medio agrícola para el riego hidropónico de jitomate en invernadero.

Reactivo	Fórmula	1L (g)
SOLUCION STOCK 1 (NITRATOS Y QUELATOS)		
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂	110
Quelato de hierro al 13% (EDTA)	Fe-Que 13.2%	1.50
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	2
SOLUCION STOCK 2 (SULFATOS)		
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	8
Nitrato de potasio	KNO ₃	45
Cloruro de potasio	KCL	30
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	60
Sulfato de zinc	ZnSO ₄	0.18
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄	0.44
Sulfato de Cobre	CoSO ₄	0.04
Solubor 20.2 %	Borax 20.2%	0.40
Molibdato de Sodio	NaMo ₄ O ₇	0.02
Fosfato mono potásico	KH ₂ PO ₄	20

Se hizo una modificación durante la elaboración del medio de cultivo agrícola, al cual no se le agrego el ácido fosfórico, esto debido a que cuando se preparaba el medio de cultivo para introducir la microalga el pH era de entre 4 y 5, por lo que cuando se ajustó el pH a 6.8 (pH óptimo para la microalga en condiciones controladas) existía una mayor precipitación de sales, antes y después de la esterilización del medio de cultivo agrícola.

4.10 Ajuste de pH

Para el ajuste de pH del medio de cultivo agrícola elaborado en el laboratorio de microalgas, se utilizó Hidróxido de sodio (NaOH) al 1M (Jalmek 95% de pureza), mientras que para el ajuste del agua residual de invernadero se utilizaron 0.8 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (ALCALI con 99% pureza).

4.11 Monitoreo de luz y temperatura.

4.11.1 Luz

Se utilizaron dos tipos de lámparas; la primera fue una bombilla de luz blanca (Luz fría) de la marca y modelo Philips FT32T8/TL850 800 SERIES de 32 watts, la segunda lámpara fue Heliospectra LX60 con las siguientes características: Luz ajustable mediante el Software Heliospectra System Assistant versión 2.0.1, espectro completo de luz inteligente, temperatura de operación: 0 a 40 °C, sistema de enfriamiento mediante un ventilador a 40 °C y 60% de humedad, cuenta con 4 tipos de luz: Azul (450 nm), Roja (660 nm), Infrarrojo (735 nm) y blanca fría a 5700k.

Para el monitoreo de la emisión de luz por parte de las dos lámparas utilizadas, se utilizó una micro estación Watchdog (Series 1000), se utilizaron dos sensores para medición de luz PAR, con estos sensores se hicieron pruebas de alejamiento de lámparas para recibir la cantidad de luz establecida en cada experimento.

En algunos experimentos fue necesario controlar la temperatura, por lo que se utilizaron peceras llenas de agua donde se sumergían los frascos con los cultivos para mantener la temperatura establecida, fue por esto que, fue necesario colocar uno de los sensores dentro de una bolsa plástica transparente, y sumergirla en la pecera para tomar lectura de la luz recibida, este sensor fue retirado cuando la se obtuvo la cantidad de luz requerida.

4.11.2 Temperatura

Para el control de temperatura se utilizaron peceras con una capacidad volumétrica de 120L, con las siguientes dimensiones 1m de largo, 0.30 m de ancho y 0.40m de alto, para el aumento de la temperatura del agua se utilizaron calentadores de la marca y modelo BOYU AQUARIUM HEATER HT-2300 - 300W, para tanques con capacidad de 200-350L, con ajuste de temperatura de los 20 a 34 °C.

Para disminuir la temperatura del agua se utilizó un Chiller de la marca y modelo Boyu C-250 (C Series Water Chiller) para tanques con capacidad volumétrica de 100-600L y un flujo de 1000-2500 L/Hr, con las siguientes características de funcionamiento; permite disminuir temperaturas de 35 a 18 °C, sistema de control para establecer Set Point a la temperatura idónea. Para la circulación del agua a través del Chiller, se utilizaron bombas sumergibles de acuario (Power Head Sunny SPH-2100) con una capacidad de recirculación de 2000 l/h a una altura máxima de 2 metros con flujo regulable y Venturi.

Para el monitoreo de la temperatura se utilizó una micro estación de la marca y modelo Watchdog Series 1000, el cual cuenta con cuatro conexiones para sensores externos, además este cuenta con sensores internos para temperatura y humedad ambiental. Se utilizaron en total 3 sensores en cada pecera: uno del sistema de enfriamiento, y dos externos de la micro estación que midieron la temperatura de la pecera, y otro se colocó dentro un frasco lleno de agua con capacidad volumétrica de 1L de la marca Kimax, para ver la diferencia de lectura de temperaturas. Se exportaron los datos de la micro-estación a una base de datos de Excel, y se analizaron (la lectura del sistema de enfriamiento solo se tomó como referencia).

4.12 Experimento consumo de nutrientes

Para el experimento de consumo de nutrientes, se utilizaron tres concentraciones por triplicado de medio de cultivo comercial Basal de Bold, en el primero se agregó 0.25 mL de cada compuesto (25%), para el segundo tratamiento se agregó 0.5 mL (50%) y para el tercer tratamiento se agregó 1mL de cada compuesto, este último es la concentración normal para el cultivo de microalgas, luz blanca fría de la marca Philips (FT32T8/TL850 800) a 120 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$, el pH se ajustó en cada toma de muestra a 7, dicho valor es el más cercano a 6.8 el cual es el óptimo para Basal de Bold, se colocaron 3 botellas con cada uno de los tratamientos al azar en un rack de 3 niveles a temperatura ambiental del laboratorio de microalgas, se dejaron crecer por 22 días, se tomaron 6 muestras durante el tiempo de experimentación de

aproximadamente 20 mL cada uno, se revisó la pureza del cultivo bajo microscopio, se midieron a una densidad óptica a 750 nm en un espectrofotómetro para obtener datos de duplicación celular y tasa de crecimiento por día.

Se midieron nitratos y fosfatos mediante un espectro DR6000 HACH, mediante los métodos 8039 para nitratos, conocido como método de reducción de cadmio, donde el rango de saturación es de 0 a 30 mg/L, a una longitud de onda de 500 nm y 8084 para fosfatos, el cual se mide a una longitud de onda de 880 nm, con un intervalo de saturación permitida de 0.02 a 2.5 mg/L (Hach, 2000).

4.13 Ajuste de medio de cultivo agrícola

Después del experimento de consumo de nutrientes, se hizo el ajuste del medio de cultivo agrícola, se tomaron muestras al inicio del riego y al final (agua residual), se hizo el balance para nitrógeno y fósforo por medio de los mg/L disueltos en el agua por espectrofotometría, dicho medio de cultivo fue utilizado para aclimatar la microalga a un medio de cultivo agrícola, y posteriormente al agua residual.

4.14 Experimento pH

Para el experimento de pH, se utilizaron cuatro pH en agua residual de invernadero; 6, 7, 8 y 9, se mantuvieron con una lámpara de luz blanca fría de la marca Philips (FT32T8/TL850 800) a $150 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$, se colocaron 3 botellas con cada uno de los tratamientos al azar en un rack de 3 niveles a temperatura ambiental del laboratorio de microalgas, se dejaron crecer por 14 días, se tomaron siete muestras durante el tiempo de experimentación de aproximadamente 20 mL cada uno, se revisó la pureza del cultivo bajo microscopio, se midieron a una densidad óptica a 750 nm en un espectrofotómetro para obtener datos de duplicación celular y tasa de crecimiento por día.

4.15 Experimento temperatura

Se utilizaron 3 peceras a diferente temperatura 17, 23 y 27 °C, esto con ayuda de sistemas de enfriamiento y/o calentamiento (mencionado en monitoreo de temperatura), cada una de las peceras conto con cuatro frascos de 1L, de los cuales; tres contenían los cultivos de la microalga en agua residual de invernadero, y uno en medio de cultivo Basal de Bold, el pH fue ajustado a 7 con hidróxido de sodio al 1M.

4.16 Experimento luces

Se utilizaron 3 lámparas en total, la primera se estableció a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, proveniente de una lámpara de luz blanca fría (Philips), la segunda y tercera lámparas con emisión de 4 tipos de luces de la marca Heliospectra a una intensidad de 500 y 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ respectivamente, en estas últimas dos intensidades de luces, se emitieron las 4 tipos de luz, blanca, azul, roja e infrarroja, para ayudar a controlar la temperatura de utilizaron peceras con agua a una temperatura de 23 °C, la temperatura fue mantenida mediante un sistema de enfriamiento y calentamiento (mencionado en monitoreo de temperatura).

Se colocaron 3 frascos de 1L con cultivo de microalga en agua residual de invernadero con pH ajustado a 7 con hidróxido de sodio en cada uno de los tratamientos, así como un frasco con cultivo en medio de Basal de Bold, este sin ajuste de pH.

4.17 Estimulación de la producción de astaxantina mediante diferentes tipos de luz.

Se utilizó inóculo que fue cultivado en medio de cultivo agrícola a una concentración de 1:44, después se retiraron del medio de cultivo agrícola y se colocaron en agua destilada estéril, para dar un doble grado de estrés, tanto nutricional como de luz. Se utilizaron 3 lámparas en total, a una intensidad de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, proveniente de una lámpara de luz blanca fría (Philips), la segunda y tercera fueron de la marca

Heliospectra, con emisión de luz azul y luz roja. Para controlar la temperatura en el experimento de las últimas dos luces mencionadas, se utilizaron las peceras con el sistema de enfriamiento para mantener la temperatura a 23 °C.

4.18 Extracción y cuantificación de carotenoides y astaxantina

Se realizó la extracción de carotenoides de acuerdo con la metodología reportada por Barba *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Se pesarán 0.5 g de la muestra, se les agregarán 20 mL de solución de extracción hexano:acetona:etanol (50:25:25: v/v/v) y se pondrán en agitación durante 30 min. Después se les añadirá 3 mL de agua destilada, se dejarán reposar hasta la separación de fases, se tomará la fase orgánica (fase superior) y se colocará en tubos Falcón protegidos de la luz. A la fase acuosa se le agregarán 20 mL de la solución de extracción y se repetirá el proceso. Las fases orgánicas serán mezcladas y se leerá la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 446 nm en un espectrofotómetro con celda de cuarzo. La concentración de *b*-caroteno se calculará de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

Se tomará una alícuota de 1 mL del extracto de carotenoides obtenido en la sección 4.2.2.10, el cuál será llevado a sequedad y re-suspendido en 200 mL de fase móvil. El perfil de carotenoides será realizado en el sistema de UPLC-DAD-QTOF MSE. Las muestras (2 mL) serán inyectadas en una columna Acquity BEH C8 (2.1 x 100 mm, 1.7 mm) a 35 °C. La fase móvil consistirá en (A) acetato de sodio 20 mM (pH 3.5) y (B) acetonitrilo a un flujo de 0.3 mL/min. Las condiciones de gradiente serán: 27%B a los 0 min, 99%B a los 15 min y 99%B a los 20 min, seguido de una re-equilibración de la columna (27%B a los 21 min durante 2 min), con un tiempo total de corrida de 23 min.

4.19 Análisis de datos

Se utilizó el programa estadístico StatGraphics Centurion, para el análisis de datos de cada uno de experimentos, a los cuales se trataron con un Anova y una prueba

de medias, mediante el método de Fisher LSD con un intervalo de confianza del 95%.

VI. Resultados y discusión

6.1. Mantenimiento y escalamiento de cepa axénica.

A partir de la cepa contenida en un tubo de cristal con un volumen aproximado de 10 mL se logró llevar a cabo el escalamiento de manera axénica, primero tubos y en placa Petri, donde se utilizó agar bacteriológico y Basal-Bold como medio de cultivo, después se escalaron a matraces de 200 mL, posteriormente a 500 mL y finalmente a 1L dentro de la cámara climática, estos fueron escalados con un medio de cultivo comercial (Basal-Bold), posteriormente se logró la aclimatación en un medio de cultivo agrícola elaborado en el laboratorio de microalgas a partir de sales (Nutrientes) similares a los contenidos en el agua residual de invernadero y por último la microalga fue adaptada al agua residual de invernadero (figura 2), por lo tanto la cepa con la que se cuenta en el laboratorio de microalgas, se adaptó al agua residual, por lo que de acuerdo con Valenzuela *et al.*, (2005) quien menciona que, se puede obtener casi el mismo rendimiento del cultivo de las microalgas en medio de cultivo comercial, que en uno elaborado con la cantidad de sales similares. Por otro lado, Haque *et al.*, (2017), establece que es posible el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en aguas residuales provenientes de la industria, ahora sabemos que es posible alargar el tiempo de vida del agua residual de los invernaderos, utilizando cultivos de microalgas, en este caso la producción en biomasa de *H. pluvialis*.



Figura 2: Escalamiento de la microalga *H. pluvialis* en medio de cultivo comercial Basal del Bold (1, 2 y 3) y en medio de cultivo agrícola similar al agua residual de invernadero (4 y 5).

5.2 Curva de calibración peso seco

Se obtuvieron seis puntos para la curva de calibración de *H. pluvialis*, cada uno de los puntos corresponde a una dilución distinta del stock de cultivo de microalga en medio de cultivo comercial Basal-Bold. Se proyectaron la absorbancia (eje x) y en peso seco (g/L), de cada una de las diluciones que se hizo, la dispersión de los puntos lejos de la recta, pudo deberse a la oscilación de la concentración de microalga en el cultivo, el floculo que pudo contener el cultivo (falta de agitación), error en el pesaje y/o secado de cada uno de los filtros, así como la omisión en el lavado de cada uno de los filtros con las microalga. Sin embargo, un valor de R, de la ecuación de la recta con valor superior a 0.900, es confiable para la estimación de la biomasa contenida en un líquido (figura 3).

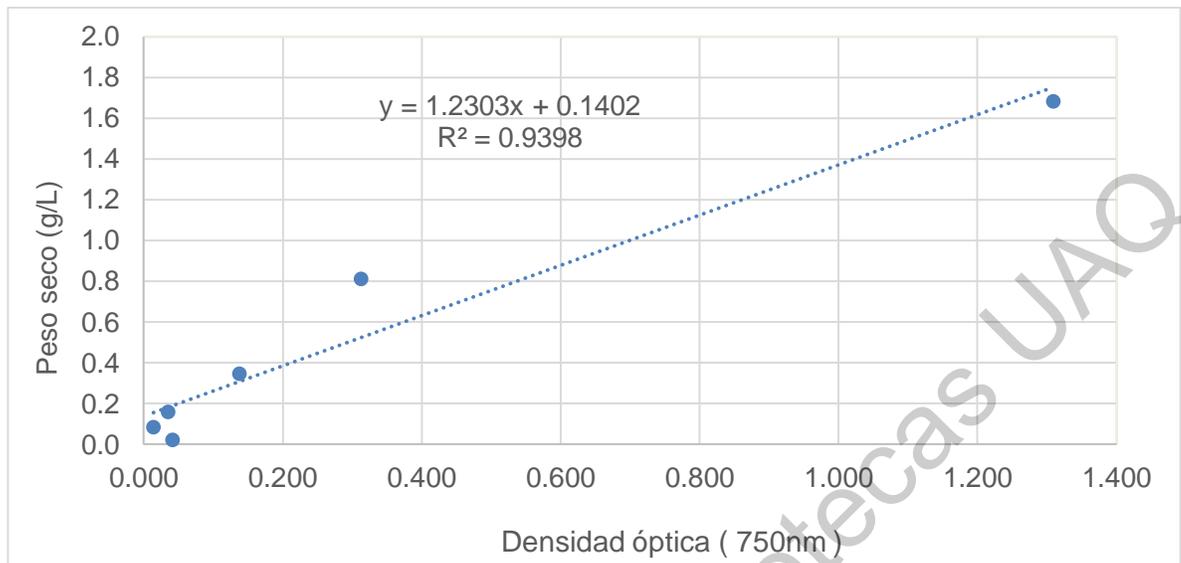


Figura 3: Curva de Calibración de peso seco de la microalga *H. pluvialis*.

5.3 Monitoreo de Temperatura

Se obtuvo el registro de datos de la temperatura ambiental dentro de laboratorio de microalgas mediante la micro estación (Watchdog), el intervalo de la oscilación de temperatura dentro del laboratorio fue de los 19.3 °C a los 22.4 °C, dichas temperatura se presentaron a las 17:55:00 pm y a las 08:55:00 am respectivamente (figura 4). Sin embargo, esta oscilación de ± 3 °C se debe a que el laboratorio cuenta con un sistema de enfriamiento, pero no un sistema de calefacción, es por ello que se muestran picos de temperaturas altas y bajas y no una temperatura que tienda a una línea con un comportamiento de zigzag con menores oscilaciones, esto sentó las bases para diseñar un sistema que permitiera mantener la temperatura en cada uno de los experimentos posteriores (excepto el experimento de pH).

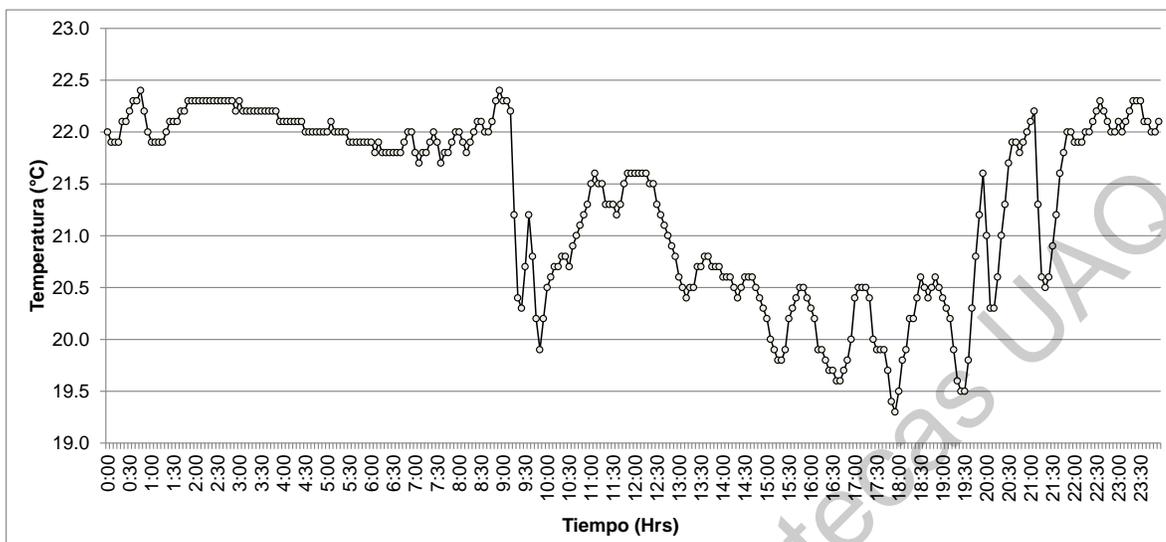


Figura 4: Monitoreo de temperatura ambiental dentro del laboratorio de microalgas por 24 horas (prueba previa a los experimentos).

5.4 Monitoreo de luz

Se obtuvieron datos de la emisión de luz de la lámpara marca Philips, el monitoreo y ajuste se hizo en base a la cantidad de luz que emite la cámara climática, y a la distancia a la que se colocan los frascos con inoculo (durante el periodo de escalamiento de la cepa), el fotoperiodo fuera de la cámara climática, se logró con la ayuda de un Timer. Los resultados de la prueba para emisión de luz y la intensidad a la que se mantuvo, fue buena, con base en que, el valor de la intensidad de luz fue de $120 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ (parte central de la gráfica), del lado izquierdo (antes de las 8:00:00 horas) existe un pequeña cantidad de luz, esto fue a causa de la emisión de luz de otras lámparas presentes en el laboratorio y el reflejo de la luz del día, para el lado derecho (después de las 20:00:00 horas) se puede observar que dicho valor de luz registrado ya no está presente, esto fue debido a que se apagaron todas las luces del laboratorio (figura 5).

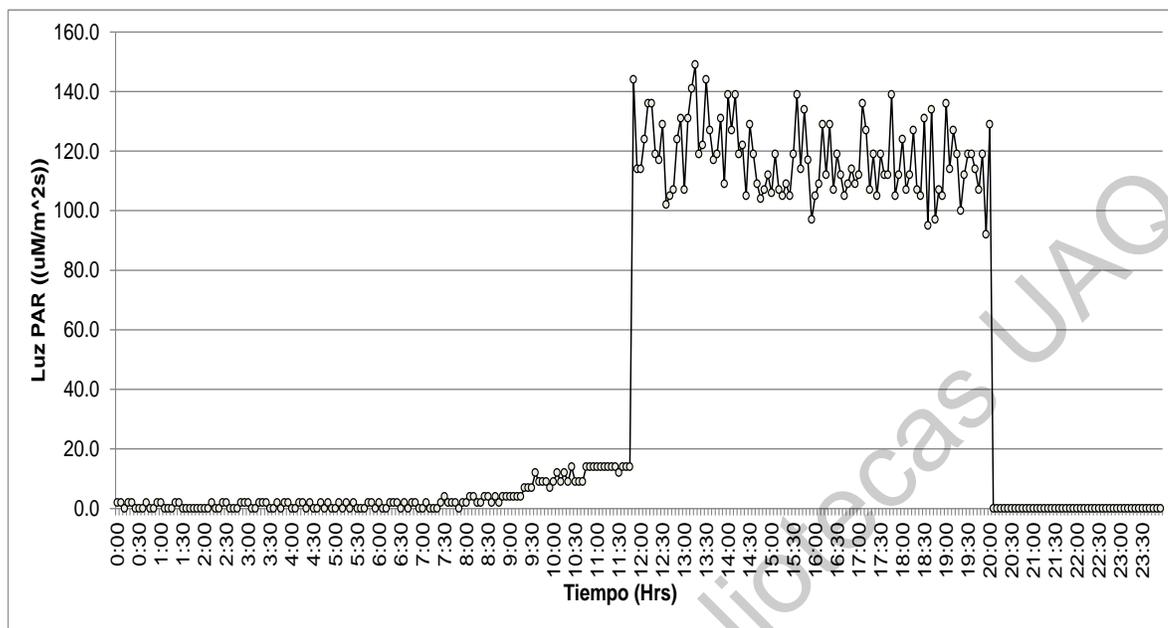


Figura 5: Establecimiento y prueba de sensor y emisión de luz de la lámpara Philips a $120 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ con un fotoperiodo de 8 horas encendido y 16 horas apagado, durante 24 horas previo al establecimiento de los experimentos.

5.5 Experimento consumo de nutrientes

La posición de cada uno de los tratamientos y sus repeticiones fueron totalmente al azar, la conexión de aire fue la misma, así como el material para aireación en cada uno de los frascos, el acomodo de los tratamientos fue como se muestra en la figura 6. En este caso los resultados obtenidos de la concentración de la microalga, fueron similares a cuando se tiene los cultivos dentro de la cámara climática, este experimento estuvo expuesto a la temperatura ambiental del laboratorio, por lo que podemos concluir que, hasta este momento, la microalga no es afectada en un intervalo de temperatura de 19 a 23 °C aproximadamente.

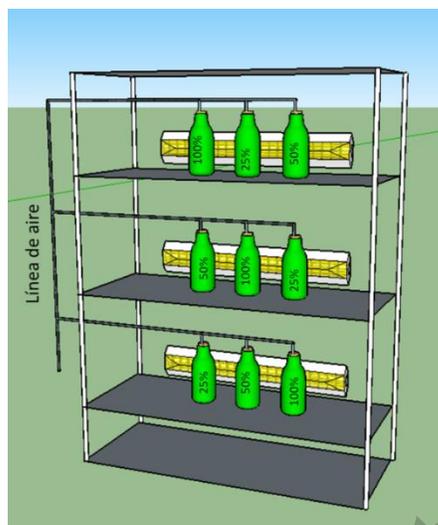


Figura 6: Diseño de cultivo de *H. pluvialis* en diferentes concentraciones de medio de cultivo Basal de Bold.

Como se puede observar en la figura 7, la variación en la concentración de nitratos en los tres medios de cultivo fue mínima, esto pudo deberse a la toma y/o el momento de agitación de cada uno de los elementos que se tomaron para la elaboración del medio de cultivo, o bien el factor de dilución durante la medición de nitratos por el método espectrofotométrico. Sin embargo, para fines prácticos del experimento, es solo para ver la variabilidad de consumo de nitrógeno en cada una de las diluciones, dicho experimento sentó las bases para hacer el cálculo de la aclimatación del medio de cultivo y el agua residual.

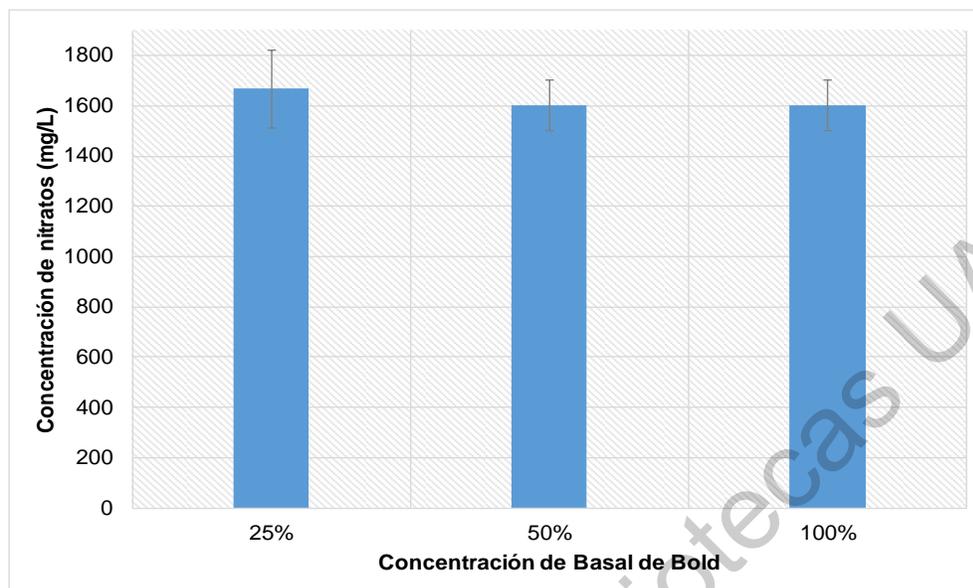


Figura 7: Concentración inicial de nitratos en los tres medios de cultivo Basal de Bold utilizado para el experimento de consumo de nutrientes.

Al comienzo del experimento de nutrientes, se volvió a tomar una muestra del cultivo, esto para saber el valor real de la concentración inicial de nitratos, esto después de la mezcla del inoculo con el medio de cultivo, los resultados demuestran que para el valor de 25%, la concentración inicial fue de 1000 mg/L, para la concentración de 50% fue de 1166 mg/L y por último para en medio de cultivo con concentración normal (100%) fue de 1300 mg/L, cabe mencionar que la variación en las concentraciones iniciales se debe a que el inoculo se mantuvo con medio de cultivo agrícola elaborado en el laboratorio, el cual contiene una gran concentración de sales. Por otro lado, el consumo de nitratos de las microalgas en los tres tratamientos resulto ser diferente, los resultados muestran el siguiente comportamiento; para el tratamiento de 25%, la concentración inicial fue de 1000 mg/L, en este se consumió un 36.67%, para el tratamiento de 50% se consumió un 51.43% y por último para el tratamiento del 100%, se consumió un 53.15% (figura 8). Dicho comportamiento se debe a la tasa de crecimiento que tiene la microalga, ya que en el tratamiento de 100% de nutrientes presento la mayor concentración de biomasa, seguido de la del 50% y por último la del 25%. Por lo tanto, podríamos

decir que, la limitación de los nutrientes en los tres tratamientos no estuvo presente, por lo menos en la cuestión de nitrógeno, esto de acuerdo a Andrade *et al.*, (2009), quien menciona que el nitrógeno es uno de los compuestos más consumidos por las microalgas, seguido del fósforo.

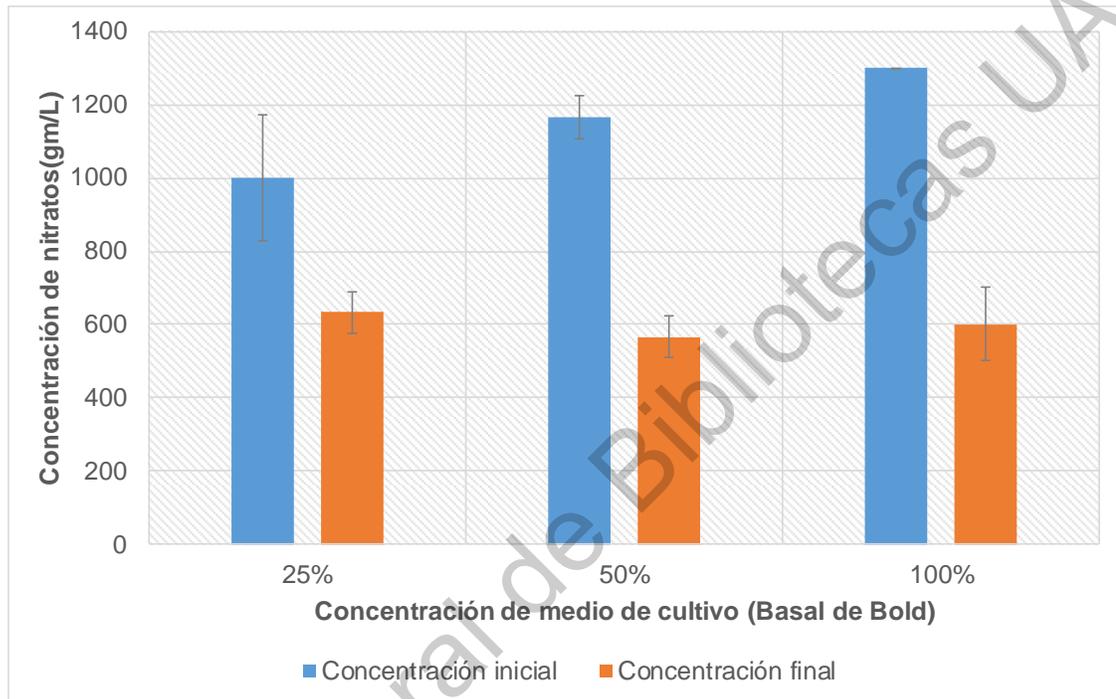


Figura 8: Consumo de nitratos por la microalga *H. pluvialis*, a distintas concentraciones del medio de cultivo Basal de Bold durante 16 días.

A diferencia de los nitratos, el resultado de la cuantificación de los fosfatos en los tres medios de Basal de Bold, mostraron concentración de acuerdo a su dilución (figura 9), ya que a las concentraciones se quedaron de acuerdo a lo establecido en cada concentración.

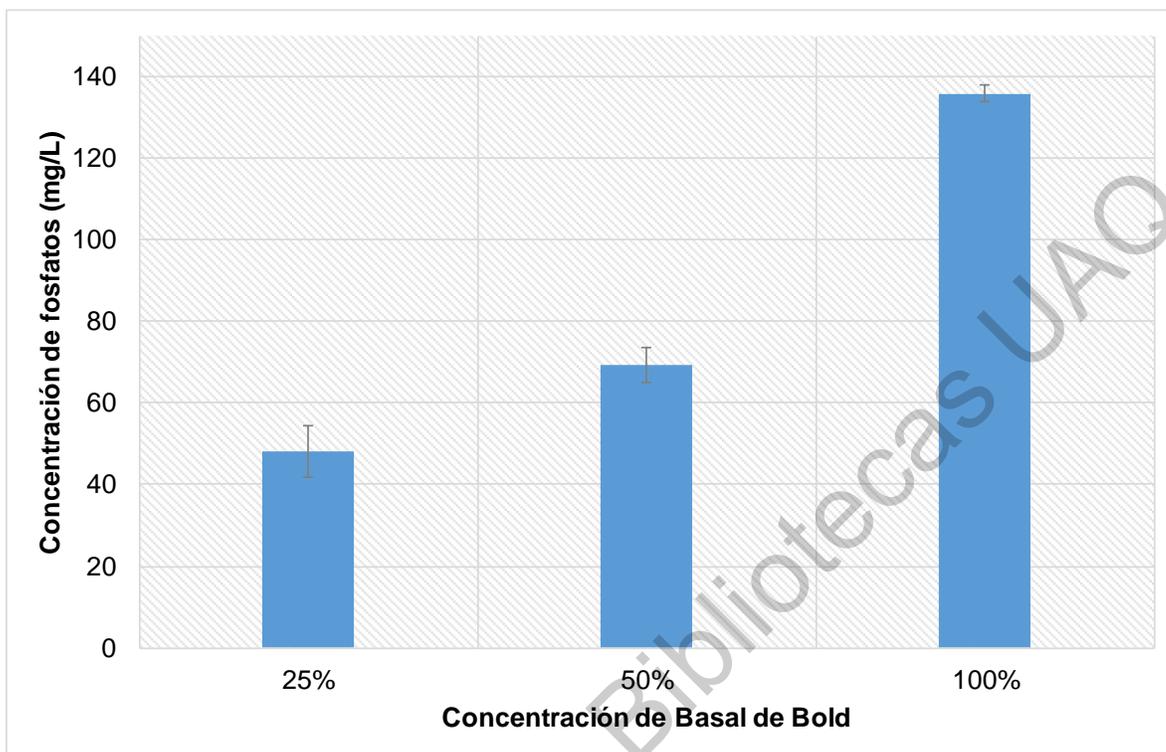


Figura 9: Concentración inicial de fosfatos en los tres medios de cultivo Basal de Bold utilizado para el experimento de consumo de nutrientes.

Al igual que sucedió en los nitratos, en los fosfatos también cambio la concentración inicial, esto debido a la mezcla entre el medio de cultivo y el inoculo, los valores reales del inicio del experimento se muestran en la figura 10, así como el consumo que tuvo la microalga durante los 16 días de cultivo. El consumo de fosfatos por la microalga fue en mayor cuando hubo una menor concentración de estos, ya que los resultados muestran que para el tratamiento del 25% se consumió un 20.83%, un 17.22 y 10.53% para el tratamiento del 50 y 100% respectivamente, dicho comportamiento de fosfatos corresponde a lo dicho por Andrade *et al.*, (2009).

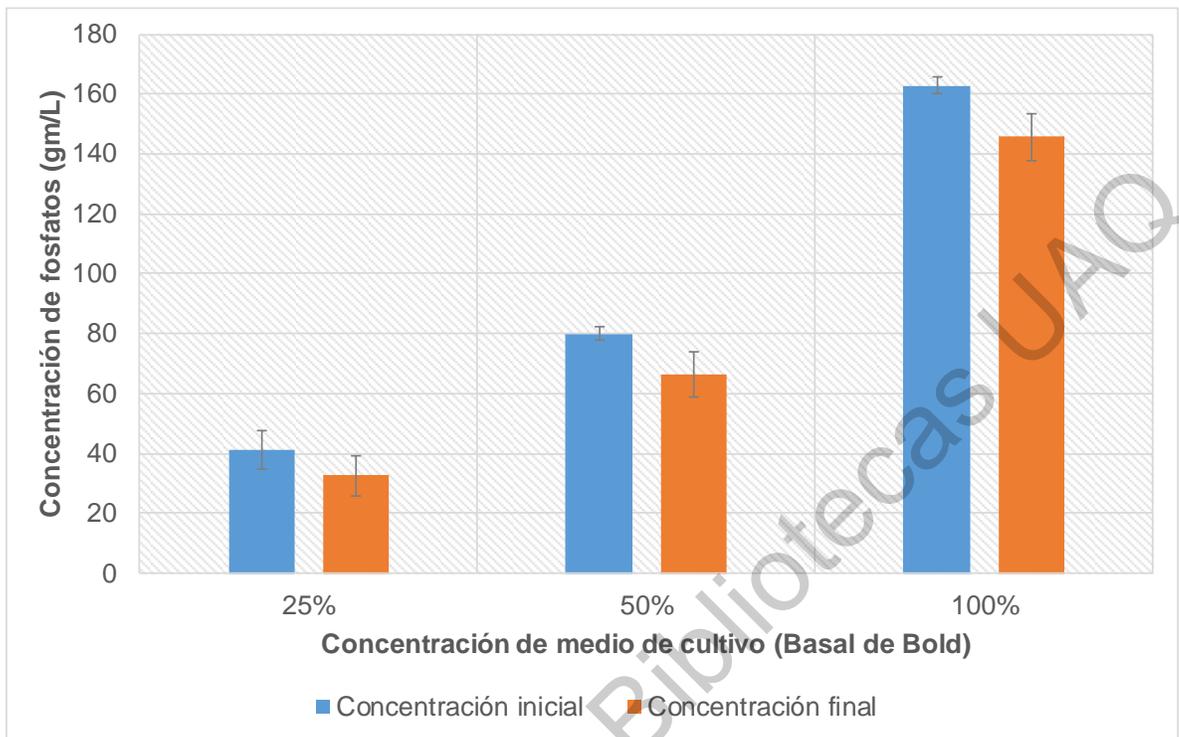


Figura 10: Concentración inicial y final de fosfatos en medio de cultivo Basal de Bold a distintas concentraciones

El crecimiento de la microalga en las tres concentraciones del medio de cultivo comercial fue similar, en cuanto a la producción de biomasa, la mayor cantidad se obtuvo en el medio de cultivo comercial al 100%, seguida del de 50% y por último el de 25%, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa (figura 11).

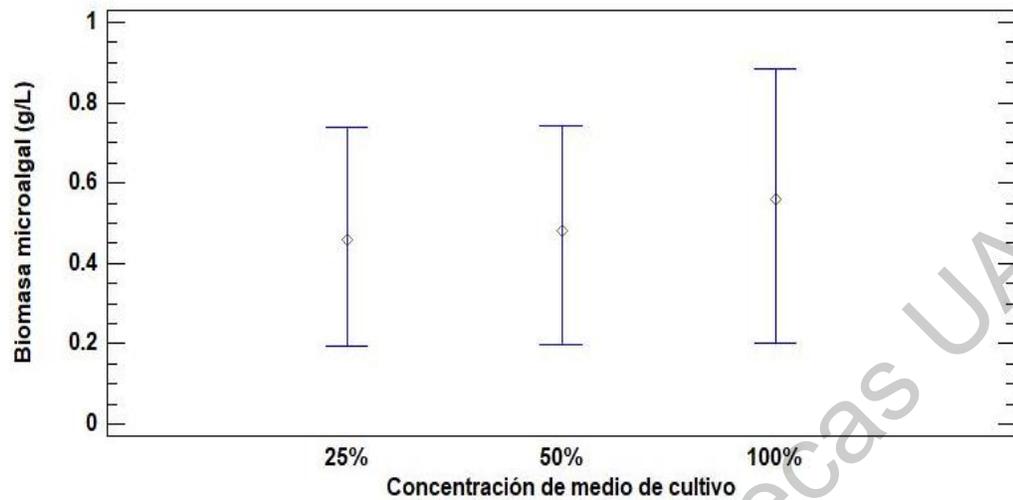


Figura 11: Análisis estadístico para las diferentes concentraciones del medio de cultivo con respecto a la producción de la microalga. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa.

La mayor concentración final se encontró en el tratamiento de 100% de Basal de Bold, esta fue de 0.9876 g/L, estando por encima de los dos tratamientos restantes, ya que la concentración final más baja se obtuvo del tratamiento de un 25% de Basal de Bold. El crecimiento de la microalga fue exponencial en los tres tratamientos, esto puede deberse a que la microalga ya estaba adaptada al medio de cultivo, el cual se usó desde un inicio en el escalamiento de la cepa, y no presentó en ningún momento números negativos en la tasa de crecimiento (tabla 3).

Tabla 3: Tasa de crecimiento y producción en gramos por litro de la microalga *H. pluviialis* en medio de cultivo Basal de Bold a distintas concentraciones.

Día	Basal de Bold					
	100%		50%		25%	
	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.0000	0.1897	0.0000	0.1865	0.0000	0.1808
2	0.1355	0.2488	0.1402	0.2468	0.1421	0.2402
5	0.2741	0.5662	0.2345	0.4997	0.2224	0.4692
9	0.0397	0.6741	0.0538	0.6205	0.0643	0.6065
16	0.0561	0.9876	0.0472	0.8701	0.0456	0.8370

5.6 Ajuste de medio de cultivo agrícola.

La cuantificación de nitratos y fosfatos contenidos en el agua de riego del invernadero, fueron muy elevadas con respecto a la concentración que se tenía en el medio de cultivo Basal de Bold, esto se puede observar en la tabla 4. Cabe mencionar que la oscilación en la concentración del agua residual de invernadero esta entre la dilución 1:44 y 1:88, es por ello que se utilizaron esos valores para cultivar la microalga en condiciones controladas en la cámara climática, los resultados del mantenimiento de la cepa, dio buenos resultados, ya que se logró cultivar en condiciones controladas a las dos diluciones mencionadas anteriormente.

Tabla 4: Concentración de nitratos y fosfatos (mg/L) contenidos en el medio de cultivo agrícola y Basal de Bold.

Medio de cultivo	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)
Agrícola inicial:	112,317 (617.12x)	21,754 (133.46x)
Agrícola final (agua residual) (1:44):	2,552 (14.02x)	493 (3.02x)
Agrícola (1:88):	1,276 (7.01x)	246 (1.50x)
Basal de Bold	182 (1x)	163 (1x)

El número que se encuentra entre paréntesis en la primera columna, indican la dilución que se utilizó de medio de cultivo agrícola inicial para aclimatar a la microalga. El número que se encuentra entre paréntesis en la segunda y tercera columna, representa el número de veces de concentración que tiene el medio de cultivo agrícola con respecto al medio de cultivo Basal de Bold.

5.7 Experimento pH

El experimento de pH fue el primero en cultivarse en agua residual de invernadero, la cual se ajustó con hidróxido de sodio al 1M a cada uno de los pH establecidos (6, 7, 8, 9), se colocaron los tratamientos completamente al azar en cada uno de los niveles (figura 12).

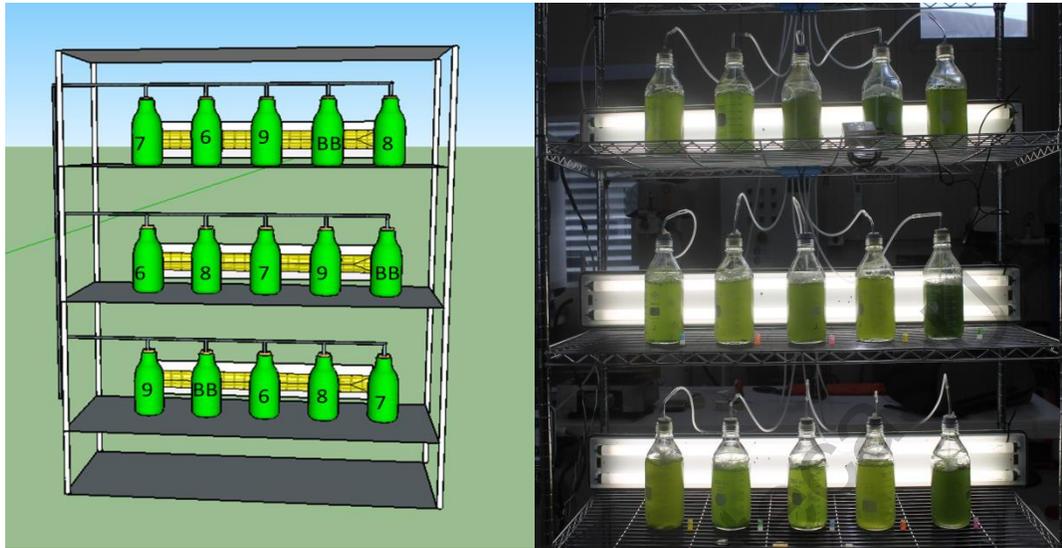


Figura 12 : Experimento de pH de *H. pluvialis* en agua residual de invernadero (Izquierda, diseño realizado en SketchUp: Software de diseño 3D, derecha sistema construido).

En comportamiento del pH en cada uno de los experimentos fue distinto, aquellos que mostraron una oscilación mayor fueron los pH de 6 y 7, ya que sus valores llegaban arriba de 8.5 y 9 respectivamente. Por otro lado, el pH 8, mantuvo su valor entre un pH 8 y 9, la menor fluctuación la presento el pH de 9, siendo este el cual se ajustó menos durante la duración del experimento. El valor del pH medio de cultivo Basal de Bold no se ajustó, es por ello que se logra ver en la figura 13, como tiende a subir hacia el valor de 9, sin embargo, su valor final fue de 8.58.

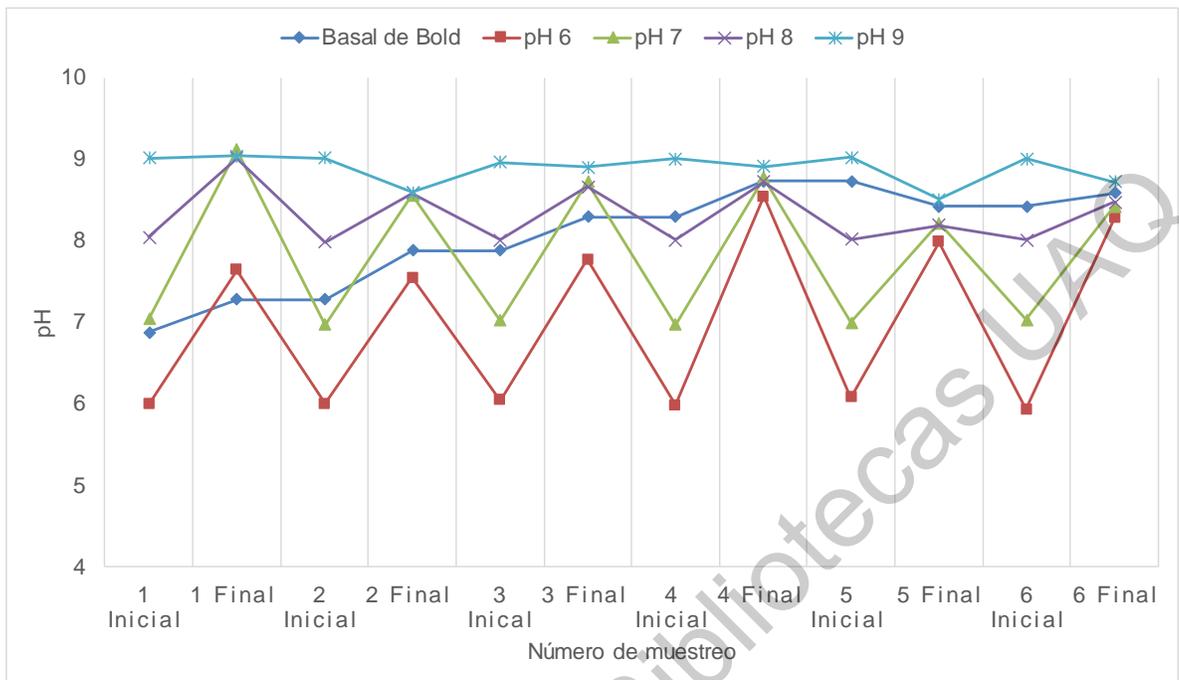


Figura 13: Oscilación del valor de pH durante el experimento, los picos superiores muestran el pH registrado en cada toma de muestra, mientras que los picos inferiores muestran el pH ajustado.

Durante el periodo de crecimiento de la microalga, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes pH, como se puede apreciar en la figura 14, hecho que puede beneficiar a la producción de la microalga, pues tendría un intervalo de pH de 6 a 9 en agua residual de invernadero, ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos pH. Dicho esto, de acuerdo con Hata *et al.*, (2001), el pH donde obtuvo mejores resultados fue a 7.85, dicho valor se encuentra dentro del rango de pH al que se sometió la microalga, en este caso, el pH 7, resultó ser el mejor para la producción de la microalga, ya que se obtuvo 0.69 g/L, coincidiendo totalmente con lo mencionado por Nagaraja *et al* (2012), quienes establecieron que el mejor pH para la producción de *H. pluvialis* es 7 (del pH 9, se obtuvo la mayor concentración de biomas mediante la lectura en el espectrofotómetro, sin embargo, la cantidad de sales pudo interferir y por ello se obtuvieron valores altos).

Sin embargo, el valor de pH 7, en ocasiones mostro una infección con hongos microscópicos, por lo que de acuerdo a lo mencionado por Hwang *et al.*, (2019), a partir de este valor es muy probable que se encuentren contaminaciones por otros microorganismos, que cuando tiene un valor de pH por debajo de 7.

Por lo tanto, un valor de pH 7 en el agua residual de invernadero, es bueno para el cultivo de la microalga *H. pluvialis*, sin embargo, como pudimos observar, en ninguno de los tratamientos hubo muerte del cultivo, por lo que, podríamos coincidir como lo mencionado con Dong *et al.*, (2007), quien menciona, que la microalga se adapta al medio, y esto va depender del lugar de su aislamiento y que puede soportar pH de 6 a 9.

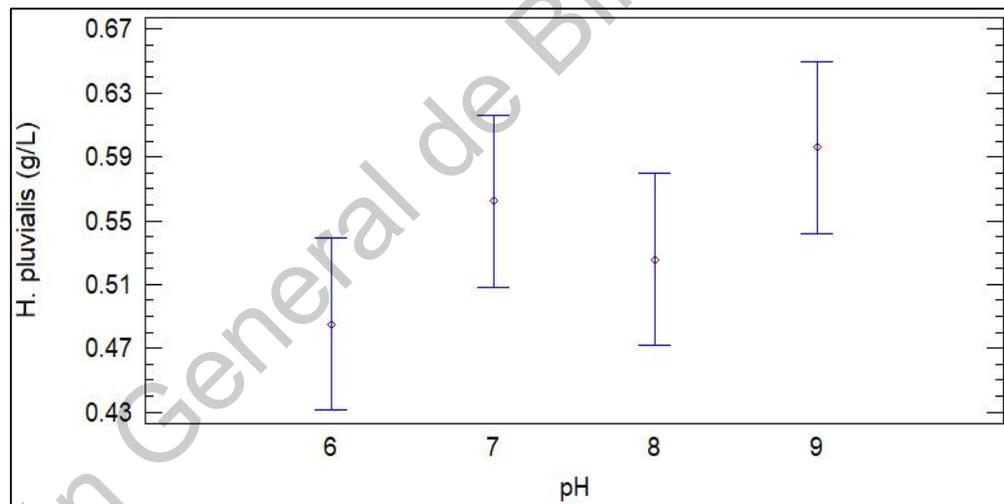


Figura 14: *H. pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero a distintos pH, debido a que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa.

El mejor resultado de la prueba de pH lo tuvo el medio de cultivo Basal de Bold, pues la producción en gramos por litro que alcanzo fue de 1.4229, en segundo lugar, con la mayor producción se obtuvo a un pH de 9 con 0.9204 g/L, y en tercer lugar se encuentra el pH 7 con 0.7773 g/L. cabe mencionar que a la hora del ajuste del

pH en el de 9, la formación de sales era clara, por lo que al haber obtenido la mayor producción puede deberse a la interferencia de las sales a la hora de la medición espectrofotométrica (tabla 5).

Tabla 5: Tasa de crecimiento y producción en gramos por litro de *H. pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero a diferentes pH, y Basal de Bold como control.

Día	pH									
	6.00		7.00		8.00		9.00		BB	
	Tasa de crecimiento	g/L								
0	0.0000	0.2836	0.0000	0.2866	0.0000	0.2789	0.0000	0.2999	0.0000	0.2808
3	0.0955	0.3730	-0.0252	0.4990	0.0827	0.3989	0.0572	0.4333	0.1896	0.5172
5	0.0671	0.4214	0.0257	0.5191	0.0731	0.4559	0.0730	0.4929	0.1312	0.6818
7	0.0379	0.4542	0.0128	0.5533	0.0376	0.5336	0.0013	0.6174	0.1193	0.8597
10	0.0899	0.5934	0.0047	0.6585	0.0281	0.7005	-0.0140	0.7406	0.0994	1.1240
12	-0.0005	0.5892	0.0672	0.6419	0.0652	0.6139	0.0660	0.6630	0.0188	1.1611
14	0.0637	0.6825	0.04	0.7773	0.0506	0.6989	0.0698	0.9204	0.1047	1.4229

5.8 Experimento temperatura

El experimento de temperatura del cultivo de la microalga se llevó acabo en agua residual de invernadero a un pH ajustado a 7, en el sistema se colocaron los frascos con la microalga dentro de peceras con agua a diferentes temperaturas 17, 23 y 27 °C, como se observa en la figura 15, para la aseveración de este experimento se hizo por triplicado y como control de coloco un frasco con cultivo, sustituyendo el agua residual por en medio Basal de Bold (control).



Figura 15: Diseño y sistema del cultivo de la microalga en agua residual de invernadero a distintas temperaturas.

No se logró obtener una diferencia estadísticamente significativa entre las tres temperaturas en la producción de la microalga, sin embargo, en cuestiones de productividad podemos observar en la figura 16, donde a 23 °C se obtuvo una mayor concentración de microalga.

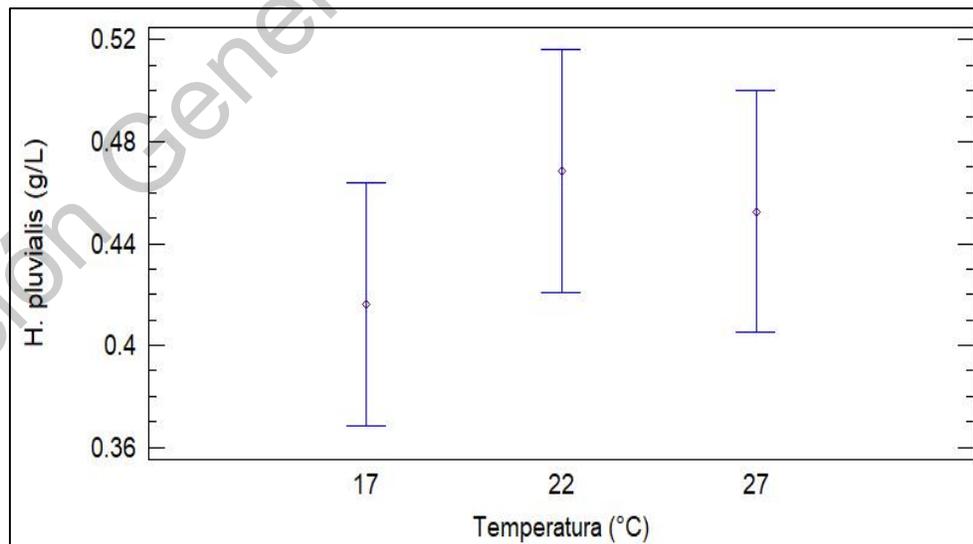


Figura 16: Análisis estadístico para el cultivo de microalga en agua residual de invernadero a diferentes temperaturas

Es difícil establecer un intervalo de temperatura para la especie, esto debido a que las variaciones que hay de una cepa a otra, les provee mayor resistencia a ciertas condiciones abióticas, tal es el caso de la temperatura en *H. pluvialis*, ya que Hata *et al.*, (2001) menciona que se puede cultivar y tener un intervalo de temperatura que puede ir de los 20 a los 24 °C, ya que, si se somete un cultivo a menores y mayores temperaturas, el crecimiento de la microalga se ve afectado, donde hasta cierto punto se concuerda con mencionado por los autores, ya que en este experimento la menor temperatura fue a 23 °C, la cual está dentro del intervalo.

En contraste a lo que dice Giannelli *et al.*, (2014) quien en los cultivos a 30.5 °C obtuvo el mejor rendimiento, y no a 20, 23.5 y 27, caso contrario a los resultados de este experimento, ya que, a los 27 °C, se obtuvo una concentración intermedia producida entre los tratamiento de 17 °C y 23 °C. al igual que Giannelli, Wan *et al.*, (2014) proponen que la temperatura ideal está por encima de los 25 °C, ya que sus resultados demuestran que a los 28 °C, es la temperatura óptima para la producción en biomasa de la microalga, sin embargo en uno de los estudios más recientes elaborado por Hong *et al.*, (2015), establece que la temperatura del cultivo debe ser a 23 °C, para obtener una mayor concentración de biomasa, por lo tanto, el resultado que obtuvimos coincide totalmente con esta aseveración, a los 23 °C se obtuvo la mejor concentración de biomasa.

Con base a lo mencionado anteriormente, podemos decir que, la mayor concentración de microalga se obtuvo a los 23 °C, alcanzando una producción de 0.5163 g/L en 7 días, y en el Basal de Bold se obtuvo un mayor rendimiento a los 27 °C. La temperatura óptima de la microalga en el laboratorio es de aproximadamente 22 °C lo que quiere decir que, para un cultivo en agua residual, se sigue respetando dicha temperatura, ya que la microalga está climatizada (tabla 6).

Tabla 6: Tasas de crecimiento producción en gramos por litro de la microalga *H. pluviialis*, cultivada en agua residual de invernadero y Basal de Bold a tres temperaturas distintas.

Agua residual de invernadero						
17 °C		23 °C		27 °C		
Día	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.0000	0.3207	0.0000	0.3126	0.0000	0.3103
2	0.1115	0.5152	0.1114	0.5280	0.1003	0.5035
4	0.0407	0.4146	0.1041	0.5174	0.0986	0.4931
7	0.0653	0.4138	0.0987	0.5163	0.0950	0.5033

Basal de Bold						
17 °C		23 °C		27 °C		
Día	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.0000	0.3193	0.0000	0.3128	0.0000	0.3039
2	0.0484	0.3518	0.1374	0.4117	0.1174	0.3844
4	0.0256	0.3703	0.0591	0.4633	0.0634	0.4364
7	0.1277	0.5431	0.0813	0.5912	0.1098	0.6067

5.9 Experimento de luces

La emisión de luces en cada uno de los cultivos era importante, esto para mantener constante la intensidad de la luz que recibió cada uno de los tratamientos, por ello se hicieron pruebas en cada uno de los niveles para obtener datos de la interferencia de cada una de las luces, el sistema construido quedo como se observa en la (figura 17).

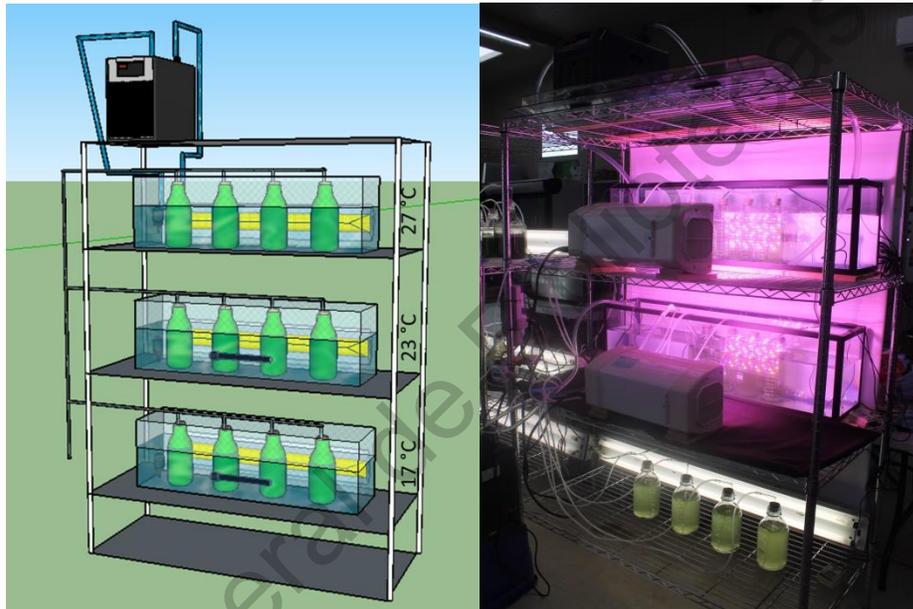


Figura 17: Diseño y sistema del cultivo de la microalga en agua residual de invernadero a 150, 500 y 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$.

Cuando se expone la microalga a distintas intensidades de luz, esta puede mantenerse en estado vegetativo, en dicho estado es donde existe la mayor tasa de reproducción, y/o entrar en estado de enquistamiento, este se presenta cuando existen factores abióticos que causan estrés oxidativos, en este caso la luz juega un papel importante para el cultivo de la microalga, ya que de acuerdo a Ma *et al.*, (2018) la menciona como uno de los mejores métodos para la producción de biomasa y del pigmento astaxantina, ya que causa un alto grado de estrés casi de inmediato.

La luz para mantener la producción de la microalga en estado vegetativo esta entre 100 y 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz blanca fría, ya que se mantuvo de color verde (estado vegetativo), lo que indica que existe división celular y no existe un grado de estrés para cambiar a estado de producción de pigmentos, dicho esto, Park *et al.*, (2001), menciona que cuando somete los cultivo de la microalga a 75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, la acumulación de biomasa es mayor, a cuando se somete a menores intensidades y/o a intensidades por encima de los 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, sin embargo, cuando se trata de producir el pigmento astaxantina, dicha intensidad fue a la que se obtuvo la mayor concentración. Por otro lado, Ki *et al.*, (2006), demostró que, se pueden someter los cultivos a pulsos de luz por dentro y por fueron de los cultivos, y los resultados son muy similares o mayores, que cuando se tienen los cultivos expuestos solo a fotoperiodos continuos, sin embargo, esto aumenta el costo de producción debido a la demanda de energía eléctrica.

A diferencia de la luz blanca emitida a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, la emisión de las cuatro luces sobre los cultivos de *H. pluvialis* a las intensidades de 500 y 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, causaron un cierto grado de estrés oxidativo casi de inmediato, puesto que los cultivos al día 3, comenzaron a cambiar de color verde a color marrón, lo que indica que iniciaron un proceso de producción de pigmentos rojos, entre ellos la astaxantina. Cabe mencionar que la intensidad de luz emitida sobre los cultivos, fue en exceso, pues en los trabajos la intensidad manejada está por debajo de los 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, es por ello que el cambio de un estado a otro se dio casi de inmediato (figura 18).



Figura 18: Diferencia de coloración de la microalga *H. pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero a diferentes intensidades de luz (izquierda a derecha): 1000, 500 y 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

De acuerdo al análisis estadístico de ANOVA y prueba de medias, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las luces establecidas en el cultivo de la microalga en agua residual de invernadero (figura 19).

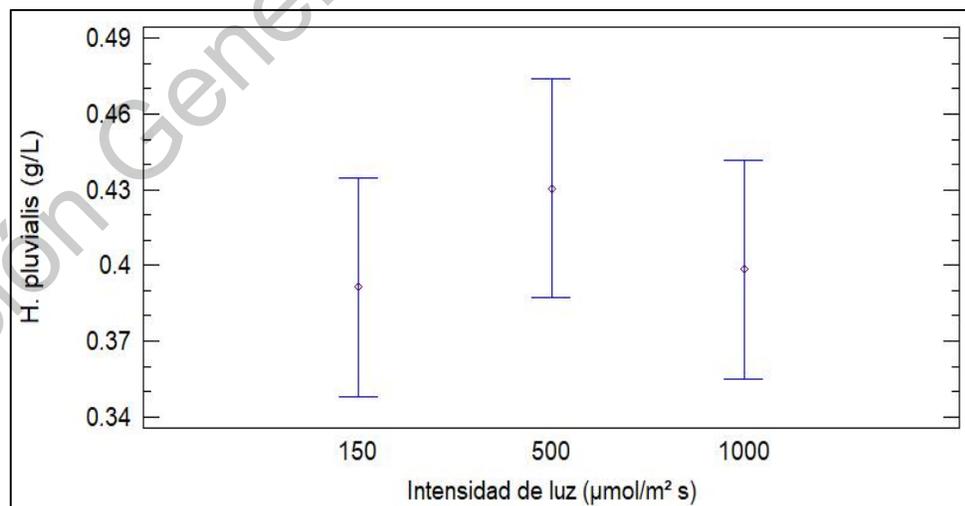


Figura 19: Producción de microalga a diferentes intensidades de luz cultivada en agua residual de invernadero

La intensidad de luz emitida sobre los cultivos, se comportó de distinta manera, mientras que la para el cultivo sometido a 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ en agua residual de invernadero, dio mejor resultado en cuando la acumulación de biomasa, sin embargo, esta cambio de estado vegetativo a estado de enquistamiento, seguido de la intensidad de luz a 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, dicho tratamiento presento la segunda acumulación más elevada de biomasa, y por último, la emisión de luz blanca a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (tabla 7), esto podría deberse a que la mezcla de luz blanca, azul, roja e infrarroja, estimula la división celular en mayor medida que la luz blanca. Con respecto a los cultivos en medio Basal de Bold, estos respondieron de manera totalmente contraria ya que, la mayor productividad se obtuvo a los 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, seguida de la de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, y, por último, 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Tabla 7: Tasa de crecimiento y producción de biomasa de la microalga *H. pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero expuesta a tres intensidades de luz.

Intensidad de luz ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) en agua residual de invernadero						
1000.00		500.00		150.00		
Día	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.0000	0.2570	0.0000	0.2547	0.0000	0.2623
2	0.1358	0.3344	0.1287	0.3273	0.1008	0.3175
5	0.1086	0.4707	0.1799	0.5623	0.1286	0.4705
7	0.0220	0.4818	-0.0781	0.4790	-0.0006	0.4692
9	-0.0354	0.4477	0.0504	0.5298	-0.0300	0.4378

Intensidad de luz ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) en medio de cultivo Basal de Bold						
1000.00		500.00		150.00		
Día	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.0000	0.1978	0.0000	0.2095	0.0000	0.2031
2	0.0997	0.2415	0.1741	0.2968	0.0866	0.2415
5	0.3149	0.6211	0.2675	0.6622	0.4180	0.8462
7	-0.1346	0.4745	-0.0189	0.6377	-0.1389	0.6410
9	0.0138	0.4878	0.0279	0.6743	0.0346	0.6869

5.10 Experimento tipo de luces.

La luz afecto de distinta manera a la microalga, mientras que por un lado la luz blanca resultado ser la mejor para la reproducción de la microalga, ya que esta se mantenía en estado vegetativo (verde), en contraste con las luz roja y azul, las cuales causaron un grado de estrés oxidativo, por lo que la microalga respondió sintetizar pigmentos de la clase carotenoide, lo cual va de acuerdo a lo que menciona Wong *et al.*, (2016), que cuando existe una combinación de luces o la luz roja y azul por si solas, causan un grado de estrés oxidativo, lo que provoca un cambio de coloración en la célula, debido a la síntesis de los compuestos de la clase carotenoide, en sus resultados demuestran que la luz blanca puede tener en mismo efecto sobre las microalgas a un intensidad de $170 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, que cuando se someten a la luz azul y roja.

Por otro lado, la coloración en los cultivos sometidos a diferentes tipos de luz fue distinto, el cambio en la coloración de la célula fue gradual, sin embargo, para los cultivos que estuvieron expuestos a la luz azul y roja, el cambio en la coloración fue a partir del día tres, mientras que, para el cultivo expuesto a luz blanca, la mayoría de las células no cambio de coloración. Por lo tanto, dicho experimento coincide con el experimento de Sun *et al.*, (2001), quien menciona que para la producción de astaxantina, la combinación de luces como la roja y blanca puede incrementar la concentración de pigmentos en la célula, esto cuando se exponen a intensidades de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ (figura 20).

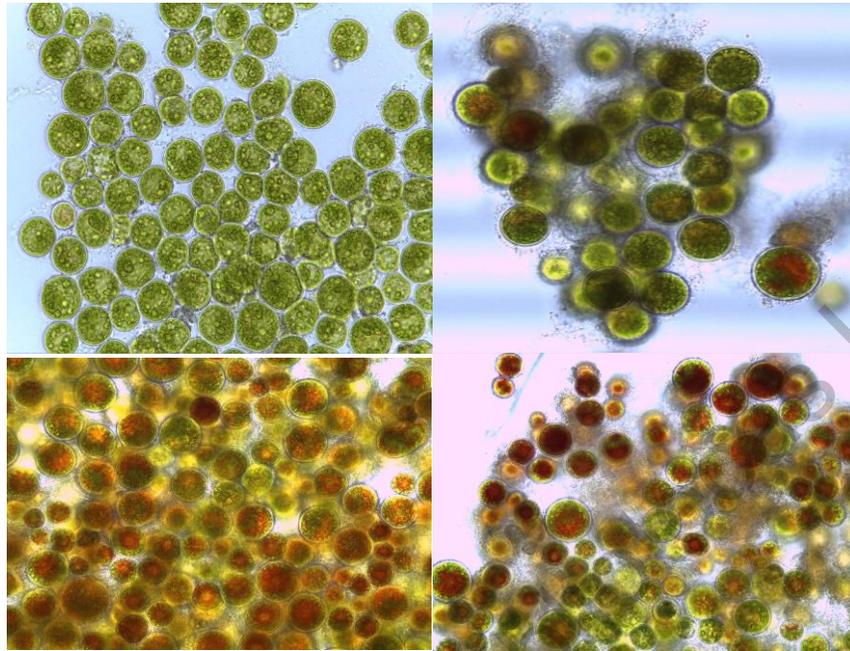


Figura 20: Inoculo de *H. pluvialis* en agua residual de invernadero (arriba izquierda), *H. pluvialis* a los 8 días de exposición de luz blanca (arriba derecha), azul y roja (abajo izquierda y derecha respectivamente), vista bajo microscopio a 40x, con un fotoperiodo de 11:13 luz-oscuridad.

La emisión de distintos tipos de luces (blanca, azul y roja) (figura 21), no afectó el crecimiento de la microalga, como se puede observar en la tabla 8, la concentración de biomasa microalgal fue siempre en aumento, además en los tres tratamientos se obtuvo una concentración mayor a 1g/L en un periodo de 10 días. La mayor concentración se obtuvo en el tratamiento de luz roja con 1.563 g/L, en contraste con la luz blanca y azul, las cuales terminaron en la misma concentración de 1.439 g/L.

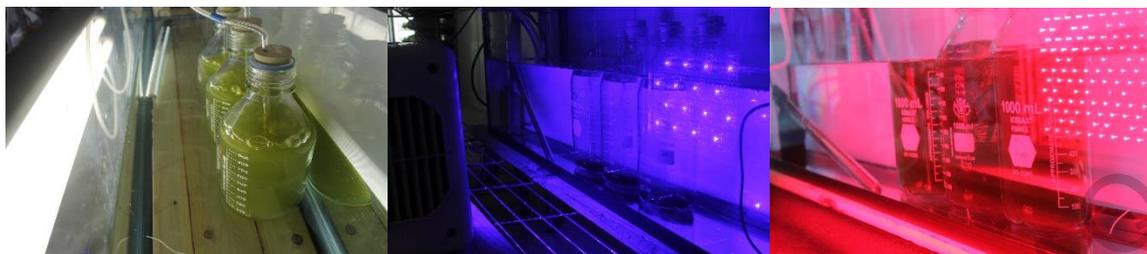


Figura 21: Cultivos de *H. pluvialis* en agua residual de invernadero sometido a distintos tipos de luz (de izquierda a derecha: luz blanca, azul y roja), a una intensidad de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 10 días.

Para el experimento de los diferentes tipos de luz, la mayor concentración se obtuvo en la luz roja, con una concentración final de 1.563 g/L , seguida de la luz blanca y azul con la misma concentración de biomasa final 1.43 g/L (tabla 8).

Tabla 8: Tasa de crecimiento y producción de biomasa de *H. pluvialis* sometida a distintos tipos de luz a $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Día	Luz ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)					
	Blanca		Roja		Azul	
	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L	Tasa de crecimiento	g/L
0	0.000	0.772	0	0.835	0	0.673
3	-0.052	0.695	0.106	1.032	0.099	0.82
6	0.151	1.094	0.023	1.104	0.064	0.994
8	0.127	1.412	0.106	1.365	0.102	1.218
10	0.010	1.439	0.068	1.563	0.083	1.439

La variación del pH en los cultivos de la microalga en el agua residual de invernadero, oscilaron entre 7 (valor ajustado) y 8.5 (figura 22), para cada uno de los tratamientos, la tasa de crecimiento fue positiva (con excepción del día 3 en el tratamiento de luz blanca), y la concentración de biomasa fue en aumento, por lo tanto, el valor de pH 7, fue hasta el momento el mejor para el cultivo de la microalga

en agua residual de invernadero a distintos tipos de luces, ya que no afecto el crecimiento de la microalga en ninguno de los 3 tratamiento.

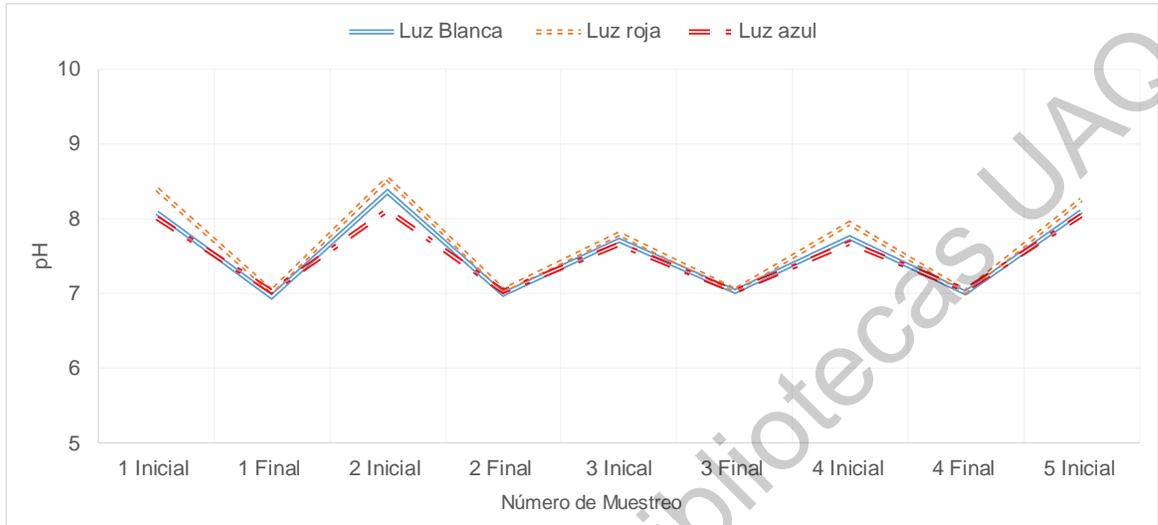


Figura 22: Ajuste de pH (7) durante el cultivo de *H. pluvialis* sometido a distintos tipos de luz durante 10 días.

VII. Conclusiones

El agua residual de invernadero tiene potencial de ser medio de cultivo para microalga, en este caso para *H. pluvialis*, ya que se pudo cultivar la microalga en las distintas concentraciones de sales (nitratos y fosfatos) en el agua.

El ajuste del pH del agua residual de invernadero a 7, resulto ser el mejor para la producción de biomasa microalgal, así mismo, la temperatura óptima mantener a la microalga en estado vegetativo (biomasa) fue a 23 °C.

La exposición a diferentes intensidades de luz sobre los cultivos en agua residual de invernadero, permitió cambiar el estado de la microalga de estado vegetativo a estado de enquistamiento, lo que favoreció la producción de pigmentos de clase carotenoide. Siendo la intensidad de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ la óptima para mantener el cultivo en estado vegetativo y por encima de este valor para causar un estrés para la síntesis de carotenoides, entre ella la astaxantina.

La luz azul y roja a 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, permitieron sintetizar compuestos de clase carotenoide en mayor medida que la luz blanca.

VIII. Bibliografía

Abalde, J., Orosa García, M., Torres, E., y Cid, A. (1999). La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina.

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., y Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275.

Aguilar, R. M., Vidales F. I., Muñoz, Flores J. H., Hernández L. H., (2004). Hidroponia aplicada en tomate, como alternativa sustentable en la comunidad Indígena de nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán.

Amos, R. (2005). *Handbook of Microalga. Culture Biotechnology and applied Phycology*

Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., y Morales, E. D. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.

Ashraf, M., Javaid, M., Rashid, T., Ayub, M., Zafar, A., Ali, S., y Naeem, M. (2011). Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers for Mass Culture of Freshwater Algae, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13(4).

Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., y De Tejada, M. L. S. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food chemistry*, 95(2), 328-336.

Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H., y Shariff, M. (2015). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(13), 2209-2222.

Boussiba, S. (1999). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 111-117

Brito, D. J., Caña, E., Guevara, M., Subero, J., Colivet, J., y Colorado, C. 2016. Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum* Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 4(1), 15-26.

Burgess, S. J., Tamburic, B., Zemichael, F., Hellgardt, K., y Nixon, P. J. (2011). Solar-driven hydrogen production in green algae. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 75, pp. 71-110). Academic Press.

Castillo, C. M. N., Rivera, F. C. R., Díaz, L. E., y Díaz, A. G. L. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31.

Choubert, G., y Heinrich, O. Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*, 112(2-3), 217-226, 1993.

Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., y Peng, C. A. (2018). Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology*, 256, 548-551.

Ding, W., Zhao, P., Peng, J., Zhao, Y., Xu, J. W., Li, T y Yu, X. (2018). Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal research*, 33, 256-265.

Dominguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jeronimo, F. M., & Campocoso, A. T. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 92(2), 209-214.

Dong Yi-ting, LI Fu-sheng, LI Tao y LI Ai-Fen.. (2007) Studies on temperature, illumination and pH of green vegetative cell of *Haematococcus pluvialis* CG-11, 26(2): 131-136.

Forbes, T., García, M. A., Alarcón, J. I., y Armas, E. 2017. Empleo de ficocianina como colorante natural en la Industria Alimentaria. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 23(1).

Forbes, T., García, M. A., Alarcón, J. I., y Armas, E. 2017. Empleo de ficocianina como colorante natural en la Industria Alimentaria. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 23(1).

Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Xu, D., Zhao, Y., Wang, Y., y Ye, N. (2012). Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*. PLoS One, 7(8), e42243.

Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., y Yamaji, H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of bioscience and bioengineering, 119(3), 345-350.

Gómez Luna, L. M. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química, 19(2).

Guerin, M., Huntley, M. E., y Olaizola, M. (2003). *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. TRENDS in Biotechnology, 21(5), 210-216.

Guerrero, M. G., Rodríguez, H., Vargas, M., García-González, M., Campo, J. A. D., Moreno, J., y Rivas, J. (1999). Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.

Hammouda, O., Abdel-Raouf, N., Shaaban, M., Kamal, M., & Plant, B. S. W. T. (2015). Treatment of mixed domestic-industrial wastewater using microalgae *Chlorella* sp. J. Am. Sci, 11(12), 303-315.

Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., y Chiang, Y. W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Food and Bioproducts Processing, 99, 1-11.

Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., y Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. Journal of Applied Phycology, 13(5), 395-402.

Hempel, N., Petrick, I., y Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. Journal of applied phycology, 24(6), 1407-1418.

Hong, M. E., Hwang, S. K., Chang, W. S., Kim, B. W., Lee, J., y Sim, S. J. (2015). Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under

high temperature via heat stress-driven Haber–Weiss reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(12), 5203-5215.

Hors, J. P. C. (2009). Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles.

<https://globenewswire.com/news-release/2018/04/23/1485271/0/en/Astaxanthin-Market-worth-over-800-million-by-2024-Global-Market-Insights-Inc.html>

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-astaxanthin-market>

Hwang, S. W., Choi, H. I., & Sim, S. J. (2019). Acidic cultivation of *Haematococcus pluvialis* for improved astaxanthin production in the presence of a lethal fungus. *Bioresource technology*, 278, 138-144.

Ibáñez, S., Felipe, R., y Calderón Rodríguez, A. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. *Ecología aplicada*, 4(1-2), 128-133.

Jacob-Lopes, E., Ramírez-Mérida, L. G., de Menezes, C. R., y Zepka, L. Q. (2015). Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Ciência e Natura*, 37, 07-17.

Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., y Bhushan, S. (2003). *Microbial pigments*.

Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., & Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and microbial technology*, 35(1), 81-86.

Kim, J. Y., Lee, C., Jeon, M. S., Park, J., y Choi, Y. E. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresource technology*, 2018.

Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., y Wang, G. 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 29(6), 568-574,

Long, X., Wu, X., Zhao, L., Liu, J., y Cheng, Y. (2017). Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* cell powder on coloration, ovarian development and antioxidation capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 473, 545-553.

Lorenz, R. T., y Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in biotechnology, 18(4), 160-167.

Ma, R., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., Alsenani, F., Eltanahy, E., Netzel, M. E y Schenk, P. M. (2018). Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in Haematococcus pluvialis in response to different LED lighting conditions. Bioresource technology, 250, 591-602.

Montes, S., María, A., González Arechavala, Y., y Martín Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas.

Nagaraja, S., Arulmurugana, P., Rajarama, M. G., Sundararajb, R., & Rengasamy, R. (2012). Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga Haematococcus pluvialis Flotow. Phytos, 42(1), 59-71.

Naguib, Y. M. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. Journal of agricultural and food chemistry, 48(4), 1150-1154, 2000.

Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA) (2014). Fiscalización ambiental en aguas residuales.

Parisenti, J., Beirão, L. H., Maraschin, M., Mourino, J. L., Do Nascimento Vieira, F., Bedin, L. H., y Rodrigues, E. (2011) Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with Haematococcus pluvialis and soy lecithin. Aquaculture nutrition, 17(2), e530-e535.

Park, J. H., Yeo, I. J., Han, J. H., Suh, J. W., Lee, H. P., y Hong, J. T. (2018). Anti-inflammatory effect of astaxanthin in phthalic anhydride-induced atopic dermatitis animal model. Experimental dermatology, 27(4), 378-385.

Pietryczuk, A., Biziewska, I., Imierska, M., y Czerpak, R. (2014). Influence of traumatic acid on growth and metabolism of Chlorella vulgaris under conditions of salt stress. Plant growth regulation, 73(2), 103-110.

Piña, P., Medina, M. A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J. A., y Guerrero, M. A. (2011). Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. Revista de Investigaciones Marinas, vol. 28 no.3, pp. 225-236.

Posten C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Science* 9(3): 165-177.

Pütz, P. (2008). Eliminación y determinación de fosfato. Informe práctico. *Analítica de laboratorio y sistema de control de proceso. Productos de aplicación de laboratorio*, HACH LANGE. Estados Unidos. Pp, 4.

Rendón Castrillón, L. J., Ramírez Carmona, M. E., & Vélez Salazar, Y. (2015). *Microalgas para la industria alimenticia*.

Reyes, F. A., Mendiola, J. A., Ibanez, E., & del Valle, J. M. (2014). Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO₂-expanded ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 75-83.

Sato, H., Nagare, H., Huynh, T. N. C., & Komatsu, H. (2015). Development of a new wastewater treatment process for resource recovery of carotenoids. *Water Science and Technology*, 72(7), 1191-1197.

Saw, C. L. L., Yang, A. Y., Guo, Y., y Kong, A. N. T. (2013). Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway. *Food and chemical toxicology*, 62, 869-875.

Shah, M., Mahfuzur, R., Liang, Y., Cheng, J. J., y Daroch, M. 2016. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531,

Sipàuba-Tavares, L.H., Berchielli-Morais, F.A., y Scardoeli-Truzzi, B. (2015) Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*.

Steinbrenner, J., & Linden, H. (2003). Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant molecular biology*, 52(2), 343-356.

Strittmatter, M., Guerra, T., Silva, J., y Gachon, C. M. (2016). A new flagellated dispersion stage in *Paraphysoderma sedebokerense*, a pathogen of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of applied phycology*, 28(3), 1553-1558.

Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K. W., & Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 233, 326-331.

Valenzuela-Espinoza, Enrique, Lafarga-De la Cruz, Fabiola, Millán-Núñez, Roberto, y Núñez-Cebrero, Filiberto. (2005). Crecimiento, consumo de nutrientes y

composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias marinas*, 31(1a), 79-89.

Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., y Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource technology*, 167, 276-283.

Wang, J., Sommerfeld, M. R., Lu, C., y Hu, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202.

Wen, Z., Liu, Z., Hou, Y., Liu, C., Gao, F., Zheng, Y., y Chen, F. (2015). Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and microbial technology*, 78, 10-17.

Wong, Y. K. (2016). Effects of Light Intensity, Illumination Cycles on Microalgae *Haematococcus pluvialis* for Production of Astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 2(2).

Yoshihisa, Y., Rehman, M. U., y Shimizu, T. (2014). Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Experimental dermatology*, 23(3), 178-183.

Yúfera, E. P. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. 2). Reverté.

Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., y Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3-4), 275-281.

Zullaikah, S., Utomo, A. T., Yasmin, M., Ong, L. K., & Ju, Y. H. (2019). Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel. In *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment* (pp. 237-276). Woodhead Publishing.