



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

**EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO,  
PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis*.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:** EMILY ABIGAIL GAVILANES ZHINGRE

WILLIAM DAVID TIBA PÉREZ

**TUTOR:** DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA

**Quito-Ecuador**

**2023**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Emily Abigail Gavilanes Zhingre con documento de identificación N° 1727280412 y William David Tiba Pérez con documento de identificación N° 1751494772 manifestamos que:

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

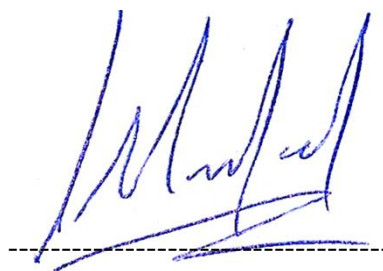
Quito, 2 de agosto del año 2023

Atentamente,



Emily Abigail Gavilanes Zhingre

C.I.: 1727280412



William David Tiba Pérez

C.I.: 1751494772

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

Nosotros, Emily Abigail Gavilanes Zhingre con documento de identificación No. 1727280412 y William David Tiba Pérez con documento de identificación No. 1751494772, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis*.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

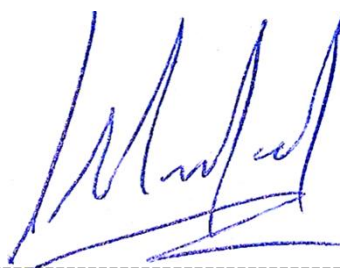
En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 2 de agosto del año 2023

Atentamente,



-----  
Emily Abigail Gavilanes Zhingre  
C.I.: 1727280412



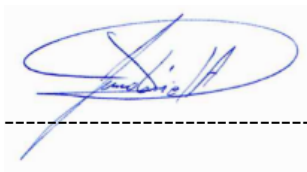
-----  
William David Tiba Pérez  
C.I.: 1751494772

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Daniel Alberto Freire Balseca con documento de identificación N° 1720534468, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis*, realizado por Emily Abigail Gavilanes Zhingre con documento de identificación N° 1727280412 y por William David Tiba Pérez con documento de identificación No. 1751494772, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 2 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Daniel Alberto Freire Balseca, MSc.

C.I.: 1720534468

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo de manera especial a Dios, por brindarme su amor y providencia en todo  
el transcurso de la carrera.

A mi madre querida por que sus enseñanzas me guían cada día a trabajar y luchar con valentía  
por lograr mis sueños.

A mi amigo y compañero, William, por sumar sus esfuerzos y motivación para culminar este  
proyecto juntos.

Y a Luis por su apoyo, amor y confiar siempre en mí.

*Emily Abigail Gavilanes Zhingre*

A Dios por haberme brindado la vida y por haberme otorgado una familia maravillosa.

A mis padres: William y Gabriela, quienes han sido uno de los ejes en mi formación tanto  
académica como personal y a quienes admiro y estimo mucho.

A mi abuelita: Georgina, por ser la que persona más importante en mi vida a la cual quiero  
tanto y que además es la que más creyó en mí y me ha demostrado que siempre puedo contar  
con su apoyo.

*William David Tiba Pérez*

## **Agradecimiento**

*Agradezco de corazón a mi Dios, por bendecirme con salud y sabiduría en toda mi vida, a la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme realizar este trabajo dentro de sus instalaciones. A William por su amistad, dedicación y responsabilidad, durante todo nuestro trabajo de titulación. A mi tutor y maestro Daniel Freire por confiar en mis capacidades y colaborar con sus conocimientos y experiencias en la realización de este trabajo, así mismo a los técnicos del laboratorio de ciencias de la vida, por brindar su valiosa y cordial ayuda en cada momento. A mi madre Rosita, quien me apoyó incondicionalmente y me dio siempre lo mejor de sí, para que yo pudiera salir adelante y superar todas las dificultades, pues fue ella quien me enseñó el amor por el estudio. A mis amigos y todas las personas quienes amablemente participaron de alguna manera en este proyecto.*

*Emily Abigail Gavilanes Zhingre*

*Primero quiero manifestar mi total gratitud al padre celestial, que con su bendición ha colmado de muchas bendiciones a mi familia y a mí, y que todo esto se lo debo a él.*

*Asimismo, agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana sede Girón, a sus autoridades, técnicos y personal de laboratorio y a cada docente, y cada docente que compone la carrera de Biotecnología porque a lo largo de estos cinco años me han sabido inculcar sus conocimientos y valores que ahora serán una base importante en mi vida profesional.*

*De igual manera quiero expresar mi más sincero agradecimiento a nuestro tutor y profesor Daniel Freire, por colaborar y dirigir nuestro trabajo de titulación, y por ser la persona que confió plenamente en nuestras capacidades.*

*También quiero dar las gracias a todas las personas que hoy en día me brindan su amistad y tiempo, así como, a las personas que conocí a lo largo de mi etapa universitaria, pero que ya no forman parte de mi vida.*

*Igualmente, agradezco a mi compañera de tesis, Emily, por su amistad a lo largo de esta etapa, al igual que el esfuerzo y dedicación puesto en este trabajo y que por fin podemos concluir.*

*Por último, agradezco infinitamente a mi familia, en especial a mi madre y abuelita paterna, ya que desde el inicio de mi carrera como al final siempre me brindaron su apoyo y cariño incondicional.*

*William David Tiba Pérez*

## Resumen

Las microalgas llaman el interés de varias industrias debido al descubrimiento de sus variadas aplicaciones y beneficios. Entre ellas destaca *Haematococcus pluvialis*, fuente del antioxidante conocido como “astaxantina”, además de otras moléculas bioactivas importantes para la salud y alimentación humana y animal. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad de los medios modificados Bristol, Rubic, BG11, y un medio artesanal propuesto, para el óptimo crecimiento de *H. pluvialis*, en los cuales se aplicó la técnica de aislamiento por estriado en medios sólidos y como técnica de purificación, se emplearon los mismos medios de consistencia líquida, donde se monitorizaron la cinética de crecimiento y cambios a nivel morfológico para esta microalga; en las unidades experimentales en tubos de 10 mL en condiciones de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y temperatura de 20 °C, por un periodo de 21 días, versus los mismos medios líquidos en matraces Erlenmeyer de 100 mL durante un periodo de 12 días con las siguientes condiciones: agitación de 140 rpm, temperatura de 20°C y con el mismo fotoperiodo antes mencionado. Los resultados presentados mediante el método de análisis de varianza de un solo factor ANOVA ( $P < 0,05$ ) indican que existe diferencia en el crecimiento de *H. pluvialis* entre el tratamiento de los cuatro medios tanto en matraces como en tubos. El mejor medio de cultivo resultó ser el medio artesanal del cual se obtuvo  $1,38 \times 10^5$  cel/mL en matraces y  $7,4 \times 10^5$  cel/mL en tubos, siendo así el medio más adecuado para el aislamiento, purificación y crecimiento de la microalga.

**Palabras clave:** Microalgas, Astaxantina, Medios de cultivo modificados, Cinética de crecimiento, Morfología.



## Abstract

Microalgae attract the interest of various industries due to the discovery of its various applications and benefits. Among them, *Haematococcus pluvialis* stands out, a source of the antioxidant known as “astaxanthin”, as well as other important bioactive molecules for human and animal health and nutrition. The purpose of this work was to evaluate the capacity of the modified Bristol, Rubic, BG11 media, and a proposed artisanal medium, for the optimal growth of *H. pluvialis*, in which the striated isolation technique was applied in solid media and as a purification technique, the same liquid consistency media were used, where growth kinetics and morphological changes for this microalga were monitored; in the experimental units in 10 mL tubes under conditions of 12 hours of light and 12 hours of darkness and a temperature of 20 °C, for a period of 21 days, versus the same liquid media in 100 mL Erlenmeyer flasks for a period of 12 days with the following conditions: stirring at 140 rpm, temperature of 20 °C and with the same photoperiod mentioned above. The results presented by means of the single factor ANOVA analysis of variance method ( $P < 0.05$ ) indicate that there is a difference in the growth of *H. pluvialis* between the treatment of the four media in both flasks and tubes. The best culture medium turned out to be the artisanal medium, which obtained  $1.38 \times 10^5$  cells/mL in flasks and  $7.4 \times 10^5$  cells/mL in tubes, thus being the most suitable medium for the isolation, purification, and growth of the microalgae.

**Keywords:** Microalgae, Astaxanthin, Modified culture medium, Growth kinetics, Morphology

## Índice de contenidos

### Contenido

1	Introducción .....	1
2	Marco teórico .....	4
2.1	Microalgas .....	4
2.2	Aplicaciones .....	4
2.2.1	Aplicación para obtención de energía limpia .....	5
2.2.2	Aplicaciones nutraceuticas .....	5
2.2.3	Aplicaciones en cosmética .....	5
2.2.4	Aplicaciones en biotecnología .....	6
2.3	<i>Haematococcus pluvialis</i> .....	6
2.3.1	Morfología.....	6
2.3.2	Taxonomía.....	6
2.3.3	Fases de crecimiento .....	7
2.3.4	Condiciones para su desarrollo .....	7
2.3.5	Hábitat natural .....	8
2.4	Medios de cultivo .....	9
2.5	Aislamiento.....	9
2.6	Purificación.....	10
3	Materiales y métodos .....	12
3.1	Recolección y verificación de la muestra .....	12

3.2	Aislamiento en medios de cultivo sólidos .....	12
3.3	Siembra en medios de cultivo modificados .....	14
3.4	Purificación en medios líquidos. ....	15
3.5	Siembra en medios líquidos.....	16
3.6	Tratamiento en Matraces .....	17
3.7	Seguimiento del desarrollo de la microalga .....	18
3.8	Recuento celular en cámara de Neubauer.....	19
3.9	Cálculo de la densidad celular .....	20
3.10	Análisis estadístico e interpretación de datos .....	21
4	Resultados y discusión.....	22
4.1	Crecimiento y aislamiento .....	22
4.2	Conteo celular de <i>H. pluvialis</i> y evaluación morfológica en tubos.....	26
4.2.1	Medio Bristol modificado .....	26
4.2.2	Medio Rubic modificado.....	28
4.2.3	Medio Artesanal .....	29
4.2.4	Medio BG11 .....	31
4.3	Conteo celular de <i>H. pluvialis</i> y evaluación morfológica en matraces con agitación.	
	32	
4.3.1	Medio Bristol modificado .....	32
	.....	34
4.3.2	Medio Rubic modificado.....	34

4.3.3	Medio Artesanal .....	36
4.3.4	Medio BG11 .....	38
4.3.5	Análisis de varianza en tubos .....	39
4.3.6	Análisis de varianza en matraces .....	41
5	Conclusiones y recomendaciones .....	43
6	Bibliografía .....	45

## Índice de figuras

Figura 1 Imagen microscópica del ciclo celular y morfológico que atraviesa <i>H. pluvialis</i> .....	7
Figura 2 Procedimiento para elaboración de medios sólidos .....	14
Figura 3 Técnica de siembra en medios sólidos.....	15
Figura 4 Dilución en serie de <i>H. pluvialis</i> .....	16
Figura 5 Técnica de siembra en medios líquidos para tubos.....	17
Figura 6 Siembra de <i>H. pluvialis</i> en matraces con medio Líquido. ....	18
Figura 7 Monitoreo del desarrollo de <i>H. pluvialis</i> .....	19
Figura 8 Recuento celular en cámara de Neubauer .....	20
Figura 9 Cuadrantes donde se realiza el conteo celular .....	20
Figura 10 Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio modificado Bristol al cabo de 30 días de su siembra .....	22
Figura 11 Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio modificado Rubic al cabo de 30 días de su siembra .....	23
Figura 12 Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio Artesanal al cabo de 30 días de su siembra	24
Figura 13 Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio modificado BG11 al cabo de 30 días de su siembra .....	25
Figura 14 Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en el medio modificado Rubic después de 12 días de su siembra. ....	34
Figura 15 Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en el medio modificado Rubic después de 12 días de su siembra. ....	36
Figura 16 Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio artesanal después de 12 días de su siembra. ....	37

Figura 17 Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en el medio BG11 después de 12 días de siembra. ....	39
Figura 18 ANOVA para los cuatro medios en tubos .....	39
Figura 19 ANOVA de los cuatro medios en matraces .....	41

## Índice de tablas

Tabla 1 Taxonomía de <i>H. pluvialis</i> .....	6
Tabla 2 Conteo celular cel/mL en medio Bristol en tubos. ....	27
Tabla 3 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio Bristol modificado durante 21 días en tubos. ..	27
Tabla 4 Conteo celular cel/mL en medio RM en tubos.....	28
Tabla 5 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio Bristol modificado durante 21 días en tubos. .	29
Tabla 6 Conteo Celular cel/mL en medio Artesanal en tubos.....	30
Tabla 7 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio artesanal durante 21 días.....	30
Tabla 8 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio BG11 modificado durante 21 días en tubos.....	31
Tabla 9 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio Bristol modificado durante 12 días en matraces. .....	33
Tabla 10 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio Rubic modificado durante 12 días en matraces. .....	35
Tabla 11 Morfología de <i>H. pluvialis</i> en medio artesanal durante 12 días en matraces.....	37
Tabla 12 Fotografías del cambio morfológico de <i>H. pluvialis</i> en medio BG11 modificado durante 12 días en matraces. ....	38
Tabla 13 Análisis de Tukey para los matraces .....	41

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Densidad Celular .....	21
-----------------------------------	----



## 1 Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares de amplia distribución geográfica que han despertado un interés por parte de la comunidad científica, farmacéutica, industria de alimentos y biotecnológica, debido al descubrimiento de sus variadas aplicaciones y beneficios.

Entre la gran variedad de especies de microalgas, *Haematococcus pluvialis*, es una de las más interesantes debido a que es una fuente de uno de los antioxidantes naturales más potentes que se conoce, cuyo nombre es astaxantina (Mularczyk et al., 2020). Este es un carotenoide que se lo ha clasificado dentro del grupo fitoquímico de la xantofila y terpenos. Además, es poseedor de un pigmento natural liposoluble, mismo que se encuentra en tanto en la carne del salmón como en el langostino. También se le atribuyen diversos beneficios para la salud humana y aplicaciones nutraceuticas (Sánchez, 2019).

En el año 1844, J.V Flotow, describió por primera vez a *H. pluvialis* (Fernández, 2014) y es en el año de 1950 que se comienza con el manejo de microalgas a escala industrial, cuando Burlew propuso el uso de estos microorganismos como fuente alternativa de proteína para plantas y animales (Mularczyk et al., 2020).

Para los años 2000 a 2013, el conocimiento acerca de la astaxantina y su potencial se había extendido por el mundo, se sabía también el limitante de costos, por lo que muchos investigadores proponían diferentes mecanismos de inducción y prevención de estrés en *Haematococcus pluvialis*, y de modificación en los medios de crecimiento con el fin de obtener mayores cantidades de biomasa y mejores retribuciones económicas (Camacho et al., 2013; Oslan et al., 2021).

Es a partir de *Haematococcus pluvialis*, que se obtiene una gran concentración del carotenoide de manera natural. En el mercado actual, la astaxantina tiene una alta trascendencia, debido a su amplia aplicación dentro de las industrias cosmética, nutraceutica, alimenticia y farmacéutica. Según Sánchez (2019), las propiedades antioxidantes de astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis* son 10 veces más fuertes en comparación con las rendidas por levaduras, crustáceos u otras

microalgas, por lo cual, son usados para combatir enfermedades neurodegenerativas. A su vez, en el ámbito alimenticio su más grande aplicación esta dado por ser un excelente colorante en alimentos.

En las experimentaciones de Quintero (2020), se concluye que *Haematococcus pluvialis* puede crecer y desarrollarse en medios de aguas residuales domésticas y porcinas. Sin embargo, es en el medio de aguas porcinas donde se produjo una mayor acumulación y síntesis de astaxantina.

Estudios recientes hablan de la necesidad de innovar la extracción de los metabolitos de *H. pluvialis*, introduciéndose a la “biorrefinería” un grupo de técnicas que conllevan la incorporación de sustancias como mioinositol, acetato de sodio, glucosa y cloruro de sodio en los medios de cultivo de *H. pluvialis*, variando sus concentraciones se ha obtenido buenos resultados en el aumento de astaxantina y biolípidos entre otros metabolitos de interés. (Khoo et al., 2019; Li et al., 2022), inclusive se ha visto su influencia sobre la morfología de la microalga permitiendo una mejor disrupción celular y bioaccesibilidad de los productos (Kim et al., 2022).

En 2014, el mercado comercial de astaxantina sintética se valoró en \$447 millones, lo que corresponde a la producción de 280 toneladas métricas por año (Koller et al., 2014, Panis y Carreón, 2016) (Khoo et al., 2019). Según el portal Mordor intelligence se proyecta que el mercado mundial de astaxantina registre un alza de 7,8% durante el período de pronóstico entre los años 2020 al 2025 (Mercado de La Astaxantina, Participación, Tamaño y Crecimiento de La Industria, 2023).

Según Granda (2015) en Ecuador realizar a gran escala la producción de *Haematococcus pluvialis* no es viable, debido a los altos costos en relación con términos de producción y a su lenta tasa crecimiento debido a sus etapas de desarrollo. Este es el principal motivo por el cual el país se ve obligado a importar astaxantina de otros países.

La presente investigación se enfocará en el estudio de la cinética de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en tres medios de cultivo modificados y un medio artesanal, debido a que es un microorganismo que actualmente se encuentra en el interés de la comunidad biotecnológica y varias industrias, ya que en estado de quiste inmóvil produce el carotenoide “astaxantina”, un antioxidante

muy potente, además de otras moléculas bioactivas. Sin embargo, la mayor producción de estos compuestos se obtiene sintéticamente y con un alto costo (Camacho Kurmen et al., 2013), por lo que el cultivo de *Haematococcus pluvialis* en un medio que reduzca los costos de producción y favorezca el desarrollo adecuado de esta microalga en su fase inicial de crecimiento, representa una alternativa biotecnológica atractiva en proyectos futuros. Por lo previamente mencionado, se evaluará los cuatro medios con el fin de saber cuáles son los más adecuados para la microalga comparar su cinética y analizar si que *Haematococcus pluvialis* es capaz de crecer en dichos medios sin padecer algún estrés. Posterior a ello, se aplicará la técnica para la purificación de microalgas denominada dilución por serie, misma que bibliográficamente ha demostrado tener buenos resultados en microalgas.

## 2 Marco teórico

### 2.1 Microalgas

Desde un enfoque biotecnológico, las microalgas comúnmente son microorganismos dependientes de la luz natural (solar) o fotoautótrofos, es decir, que necesitan la energía proveniente del sol u otra fuente artificial para producir energía química, misma que usan para su crecimiento y producción de metabolitos secundarios y pigmentos como son:  $\alpha$ -carotenos,  $\beta$ -carotenos, astaxantina, entre otros (Manrique & Marin, 2019). Aunque hay excepciones de microalgas que toman otro tipo de fuente de carbono, las cuales pueden ser: fotoheterótrofa y mixotrofa.

- Fotoheterótrofo.- Al igual que los fotoautótrofos, necesitan las ondas del sol o lumínicas como fuente primaria para obtener energía, pero se diferencian en que no emplean CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y en su lugar utilizan otras fuentes orgánicas. Por ejemplo: ácidos grasos y alcoholes.
- Mixotrofa.- Estos microorganismos son capaces de actuar bajo procesos fotoheterótrofos o fotoautótrofos, en otras palabras obtienen energía tanto de luz natural como de fuentes orgánicas (Ynga & Niño, 2019).

Otra característica importante es su amplia distribución geográfica, que pueden crecer en todos los cuerpos de agua dulce y salada como lagos, mares y ríos, también en zonas terrestres y ambientes extremos como hielos y desiertos. Sin embargo, solo se las puede visualizar mediante un microscopio porque su diámetro oscila entre 2 y 200  $\mu\text{m}$ , asimismo su ciclo de vida dura aproximadamente un día (Yordán, 2022). Por tal motivo, despierta un gran interés biotecnológico, si es que se lo mira el punto de vista industrial.

### 2.2 Aplicaciones

*Haematococcus pluvialis* es una de las microalgas más buscadas en el ámbito de la biotecnología industrial principalmente por ser una fuente natural del antioxidante astaxantina; sin embargo, se ha

visto nuevos usos, por ejemplo, en dentro de la cosmética y la generación de energía a partir de su biomasa.

### 2.2.1 Aplicación para obtención de energía limpia

Las microalgas tienen muy buenos rendimientos en lo que a producción de lípidos se refiere ya que se producen alrededor de 59 m<sup>3</sup>/ha/año, por lo que representa una alternativa para la obtención de biodiésel (Castillo et al., 2017). Las necesidades actuales de fuentes de energía alternativa limpias y con efectos ambientales reducidos sería la principal ventaja de la producción de biocombustibles a partir de microalgas.

### 2.2.2 Aplicaciones nutraceuticas

El contenido nutricional de las algas incluye lípidos, carbohidratos y proteínas que sumadas constituyen hasta el 90% de su composición, el 10% restante lo conforman minerales, ácidos nucleicos y pigmentos (Rendón Castrillón et al., 2015). En el mercado actual, es de sumo interés debido al surgimiento de los alimentos funcionales, o sea, alimentos que al consumirse generan una contribución a la reducción de enfermedades. Un ejemplo sería su uso en bebidas energéticas y suplementos dietéticos a base de astaxantina (Hoys, 2019). En varios estudios se concluye que el contenido nutritivo de las algas como alimentos podrían ayudar remediar los problemas de desnutrición en niños y adultos de generaciones presentes, y futuras en todo el mundo.

### 2.2.3 Aplicaciones en cosmética

Hoy en día se están utilizando microalgas y sus pigmentos en la elaboración de artículos útiles para el aseo y cuidado de la piel y el tratamiento de algunas afecciones como es la dermatitis o la prevención del envejecimiento. Estudios exponen que extractos de *H. pluvialis* son usados como agentes reparadores de tejidos al reducir su estrés oxidativo (Hsin-Yu et al., 2020); otro estudio que demuestra su uso en la cosmética es el de Gómez et al. (2019), en el que resaltan su enorme potencial, ya que es usado como agente protector contra rayos UV, rayos solares y por su efecto antioxidante es muy eficaz contra el envejecimiento de la piel.

## 2.2.4 Aplicaciones en biotecnología

*Haematococcus pluvialis* ha estado en el ojo de varias biotecnologías que buscan mejorar su producción y explotación a nivel industrial, el principal elemento de interés es la astaxantina, un pigmento carotenoide económicamente valioso con actividad antioxidante comprobada, ya que la mayoría de la astaxantina natural se produce a través del cultivo a gran escala de *Haematococcus pluvialis* se requiere de técnicas biotecnológicas para mejorar la respuesta fisiológica de las células de microalgas en diferentes medios y sometidas a diversas condiciones de cultivo controladas (Teng et al., 2023).

## 2.3 *Haematococcus pluvialis*

### 2.3.1 Morfología

*H. pluvialis* forma parte de la clase *Chlorophyceae* y de la familia *Haematococcaceae*, es una especie de microalga unicelular biflagelada de color verde en su fase de zoospora pero que cambia a un tono rojizo en su fase de aplanospora, dicho microorganismo es capaz de vivir tanto en ambientes acuíferos dulces como en terrestres (Cuero et al., 2019).

### 2.3.2 Taxonomía

*Haematococcus pluvialis* es una microalga unicelular y rica en producir astaxantina perteneciente a la familia *Haematococcaceae* (Pérez & Ayala, 2019).

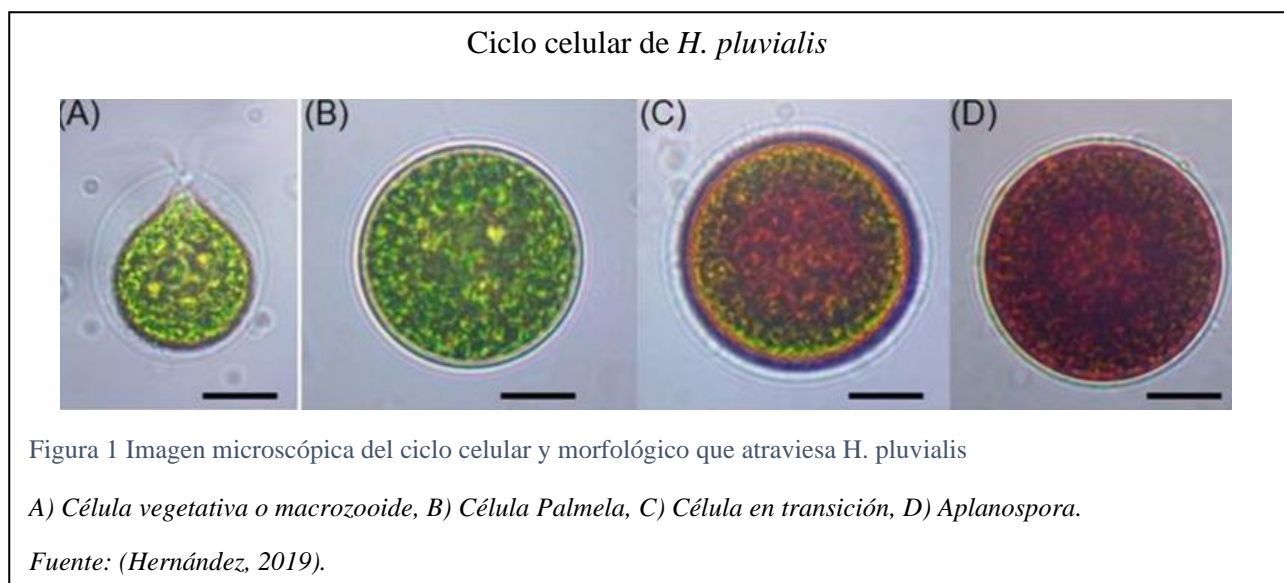
Tabla 1 Taxonomía de *H. pluvialis*

Reino	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	<i>Haematococcaceae</i>
Género	Haematococcus
Especie	Pluvialis

Elaborado por: (Pérez & Ayala, 2019)

### 2.3.3 Fases de crecimiento

El ciclo morfológico de *H. pluviialis* se comprende en 3 fases que tienen como finalidad la maduración celular, la pérdida de flagelos, aumento de volumen y grosor de sus paredes celulares. La primera es la fase macrozoide caracterizada por ser una célula biflagelada estacionaria con tamaño comprendido de 8 a 30  $\mu\text{m}$ . La segunda fase llamada palmeloide, caracterizada por estar cubierta por una membrana palmela y por mantener su división celular, lo que provoca un aumento en el tamaño de la célula llegando a medir 50  $\mu\text{m}$  y por la pérdida de los flagelos (Hernández, 2019). Por último, la fase aplanospora, se da cuando la célula ha entrado en su etapa de estrés y se caracteriza por el ensanchamiento de la pared celular o enquistamiento, lo que la hace más resistente y por ende la célula tiende a estar móvil, finalmente produciendo una alta cantidad de astaxantina, misma que es la responsable del color rojizo de la microalga (Ver figura 1) (Córdova et al., 2015).



### 2.3.4 Condiciones para su desarrollo

Para el óptimo crecimiento en condiciones de laboratorio de la microalga *Haematococcus pluviialis* y por ende, el incremento del carotenoide "astaxantina", se necesita que el entorno le proporcione las siguientes condiciones

- Relación Nitrógeno- Fósforo.

Para el crecimiento de *Haematococcus pluviialis* en cultivos dentro de laboratorio se ha encontrado que la concentración de fosfato y nitrógeno incide en el crecimiento de la microalga, en los medios

con una relación inferior a 1 entre  $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$  se mantendría las células en la etapa vegetativa por un periodo prologado de tiempo lo que permitiría alcanzar una alta densidad celular. Se atribuye a los posibles roles del fósforo en la síntesis de clorofila a través del aumento de la producción de ATP y en la acumulación de polifosfato (Nahidian et al., 2018).

- Fotoperiodo

*Haematococcus pluvialis* se ha cultivado en luz continua y con un ciclo circadiano de 12 horas de luz: oscuridad de 12 horas. Estudios reflejaron que los ciclos de luz: oscuridad produjeron densidades celulares más altas, mientras que la luz continua produjo un consumo de nitrógeno más acelerado y concentraciones finales de astaxantina más altas, por lo que este factor incide directamente en el crecimiento de esta microalga (Domínguez et al., 2019). Además, otros estudios recomiendan, las condiciones de cultivo con baja intensidad de luz, con una fuente de luz de plasma blanco (Oslan et al., 2021).

- Temperatura y pH en cultivo

Los rangos considerados óptimos de temperatura y pH para *Haematococcus pluvialis* en su fase verde son de 20 a 25 °C y el pH del medio de 6 a 8, existen casos donde ha funcionado un pH no mayor a 7,8 (Oslan et al., 2021).

### 2.3.5 Hábitat natural

El entorno natural y favorable para su crecimiento se encuentra principalmente en fuentes de agua dulces como pueden ser: lagos, ríos u agua empozada, inclusive se han encontrado en partes de rocas. Tal como indica Singh (2020), esta especie se la encuentra en casi todo el planeta con excepción de la Antártida, al tener este continente un clima de extremadamente frío. Cabe agregar que los niveles de temperatura para su buen crecimiento rondan entre los 20°C a los 30°C, aunque superar los grados de temperatura hace que esta entre en estrés y tornándose de color rojo para proteger a los quistes, lo que es beneficioso, ya que de esa manera se obtiene altos niveles de astaxantina.



## 2.4 Medios de cultivo

Existen varios tipos de medios empelados para el cultivo de microalgas de agua dulce, los cuales necesitan diferentes concentraciones de sales, micronutrientes, luz/oscuridad y pH (Leiton,2018). Por lo cual, el mejor medio será aquel que produzca una gran cantidad de biomasa de *Haematococcus pluviialis* a costos asequibles.

- Medio Rubic (RM)

La composición de este medio contiene las fuentes de carbono y otros elementos que pueden ser modificados y adecuados para el desarrollo de microalgas. Este medio se ha empleado ya que no requiere de la adición de vitaminas y es económico (Leiton, 2018).

- Medio Bristol (BM)

Medio de cultivo recomendado por la bibliografía, para el crecimiento de varias especies de organismos fotosintéticos, ya que ofrece componentes fundamentales para el desarrollo y aumento de población celular. En *H. pluviialis* se ha empleado para evaluar la producción de biomasa y ciertos metabolitos sin inducir estado de estrés (Castillo et al., 2017).

- Medio BG11

Este medio se ha utilizado en varias investigaciones en microalgas y en *Haematococcus pluviialis* debido a su composición favorece su rápido crecimiento y sus componentes son relativamente económicos, además que se puede modificar sus concentraciones para comparar la producción de bioactivos en la fase vegetativa y quiste de la microalga (Hernández Morales et al., 2015).

## 2.5 Aislamiento

Las técnicas de asilamiento en microalgas son necesarias para poder extraer cultivos monoespecíficos a partir de un cultivo madre, así mismo, son técnicas aprovechadas cuando hay contaminación bacteriana al combinarla con el uso de microscopio para de esta manera obtener una mejor muestra (Band, 2007). Dichas técnicas son diferentes para cada tipo de microalga, donde es por sus dimensiones (tamaño, motilidad y morfología), que se escoge una u otra. Es así como en combinación

de la técnica de aislamiento en placas de agar por estriado y diluciones seriadas son las más recomendadas por su simplicidad.

- Diluciones seriadas. - Este método es ampliamente recomendado cuando el tamaño de la microalga es inferior a 10  $\mu\text{m}$  y existe una alta concentración de células vivas provocando que el medio sea muy denso (Tenorio et al., 2023). El procedimiento empieza midiendo la concentración celular para determinar la cantidad de diluciones a realizar, luego se toma de la muestra madre 1 mL y es colocado en un tubo de 9 mL con el medio líquido de interés y se homogeniza. Después, se vuelve a tomar 1 mL de esta dilución y se la pasa a otro tubo con 9 mL del medio de interés, este proceso se repite hasta llegar a la dilución previamente estimada (Castillejo & Fernández, 2018).
- Aislamiento por estriado. - Esta técnica es útil para sembrar microorganismos cuando hay contaminación bacteriana, consiste en tomar con un asa bacteriológica la muestra de interés de un medio madre y sembrarla en una nueva caja Petri con medio sólido aplicando la técnica de rayado en agar y posterior dejarla a incubar a una temperatura establecida por un periodo comprendido entre 6 a 8 días (Valera, 2016).
- Pipeteo Capilar. - Al contrario que la técnica de dilución, este procedimiento es empleado cuando las microalgas alcanzan un diámetro mayor a 10  $\mu\text{m}$ . Lara (2014) detalla que esta técnica se la utiliza en base a la aplicación de un tubo capilar y un microscopio óptico, en donde, gracias a la ayuda del tubo capilar se facilita la micro pesca de las células, mismas que finalmente serán separadas en pequeñas gotas que contienen nutrientes y que luego podrán ser colocadas en una caja Petri o portaobjetos.

## 2.6 Purificación

Estas técnicas se aplican para limpiar a otros microorganismos que pudieran competir con la microalga de interés, ya sea por el espacio o por los nutrientes, generalmente son bacterias u hongos, las que están presentes en la muestra inicial o en las cepas que ya se han logrado aislar (Band, 2007).

Las técnicas de aislamiento también nos permiten purificar las células de microalgas a través de resiembras clonales sucesivas (Cultivo de Microalgas, n.d.).

La purificación se puede realizar mediante la separación de las células de las microalgas de los otros microorganismos (Band, 2007), como se describe a continuación:

- Purificación por centrifugación. - Técnica donde se separan las células de las microalgas sometiéndolas a 2000 rpm por 45 a 90 segundos, se obtendrá al fondo la masa de microalgas que será la más densa y el sobrenadante se desechará ya que su contenido menos denso serán bacterias, un método recomendado puesto que evita causar algún daño a nivel celular a comparación de otras técnicas (Band, 2007).
- Purificación con productos bacteriostáticos o antibióticos. - Son agentes de origen químico o biológico que impiden la reproducción de bacterias, en algunos trabajos se ha utilizado el telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ) en concentraciones de 10 gramos por litro, este se puede incluir en medios de consistencia líquida o sólida, y se ha demostrado que permite la obtención de medios de cultivo axénicos. Por otro lado, también se agregan antibióticos como la penicilina sódica a 400 mg/L y Estreptomicina a 200 mg/L en la preparación del medio para evitar la proliferación de bacterias (Fontecha, 2014).
- Purificación por ultrasonido o radiaciones UV. - Técnicas que utilizan sonicaciones en baño de agua y la intensidad de luz, respectivamente, si bien son efectivas pueden causar daños celulares en las microalgas (Band, 2007).

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Recolección y verificación de la muestra

La recolección de las muestras madres de la microalga fue dentro de las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Girón.

Para comenzar se homogenizó del plato hondo de cerámica, raspando con una cuchara estéril el contorno y fondo. Posterior, se procedió al almacenamiento y sellado de esta agua con tonalidad marrón-rojiza utilizando las dos botellas estériles de 400 mL.

Al tratarse de una muestra de microalgas se determinó que la irradiancia lumínica de las luces led de color blanco no debe sobrepasar los límites de 1000 a 2500 lux dentro del laboratorio (Cruz, 2019). Al ser *H. pluvialis*, una microalga a la cual se la debe estresar con la finalidad de obtener una buena cantidad de biomasa se optó por ajustar la irradiancia a 2000 lux (Martínez,2022). También cabe indicar que el sistema estaba conectado a un temporizador, mismo que según Granda (2015) para el eficiente crecimiento de este tipo de especímenes se debe mantener a un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Conforme a lo publicado por García et al. (2018) a fin de corroborar de que *Haematococcus pluvialis* estuviese presente, transcurridas 24 horas se homogeniza las muestras y se toma una alícuota de ambas, para luego colocarlas en un portaobjetos que a su vez será colocado bajo un microscopio marca “Nikon”, para corroborar la presencia o ausencia de colonias de la microalga a una resolución del lente de 10X o 40X.

#### 3.2 Aislamiento en medios de cultivo sólidos

Para el primer ensayo, se realizó el pesaje de los reactivos en balanzas analíticas para el medio Bristol Modificado, teniendo en cuenta la composición publicada por Niño et al. (2017) misma que fue alterada para producir 500 mL del medio, dando como resultado la siguiente combinación: 12,5 mg de Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 37,5 mg de Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), 125 mg de Nitrato de potasio

(KNO<sub>3</sub>), 37,5 mg de Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 12,5 mg de Cloruro de sodio (NaCl), 0,04 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 7 g de Agar.

Para el resto de los medios, se realizó el mismo procedimiento previamente detallado, siendo la principal diferencia la composición de estos. Igualmente, para el medio RM, se alteró y se usó como referencia la composición publicada por Niño et al. (2017) quedando la fórmula para 500 mL de la siguiente manera: 150 mg de Nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), 10 mg de Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 mg de Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 29,25 mg de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>), 0,15 mg de Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 3,75 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 7 g de Agar.

Para el medio BG11, se tomó en cuenta y de igual manera se modificó lo realizado por lo propuesto por Leal et al. (2012) quedando la composición para 500 mL de la siguiente forma: 0,75 g de Nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), 0,5 g de Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,5 g de Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 0,5 g de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>), 1,43 g de Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 0,05 g de Sulfato de hierro (FeSO<sub>4</sub>), 0,04 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 7 g de Agar.

Finalmente, para el medio artesanal se utilizó como referencia al medio Basal Bold realizado por Cervantes (2018) con las diferencias en las cantidades de reactivos, exclusión de componentes e inclusión de otros. Dando como resultado la siguiente constitución: 0,005 g de Urea (CH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>), 0,25 g de Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,035 g de Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 0,0125 g de sal en grano (NaCl), 0,0025 g de Sulfato de hierro (FeSO<sub>4</sub>), 0,005 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 7 g de Agar.

Obtenidos los reactivos debidamente pesados, se procede a combinar a cada uno los reactivos con 500 mL de agua destilada dentro de un frasco de vidrio autoclavable tapa azul independiente. En seguida, cada frasco fue colocado dentro de un microondas por 3 minutos para que alcance su punto de ebullición, esto a fin de integrar todos los reactivos. Posteriormente, con el uso de un potenciómetro y soluciones ácidas o básicas se ajustó el pH de los medios a un rango neutro de 6,5-

7,5 (Hwang et al., 2019). Finalmente, los frascos de vidrio serán colocados dentro del frasco autoclave por 45 minutos a 121 °C.



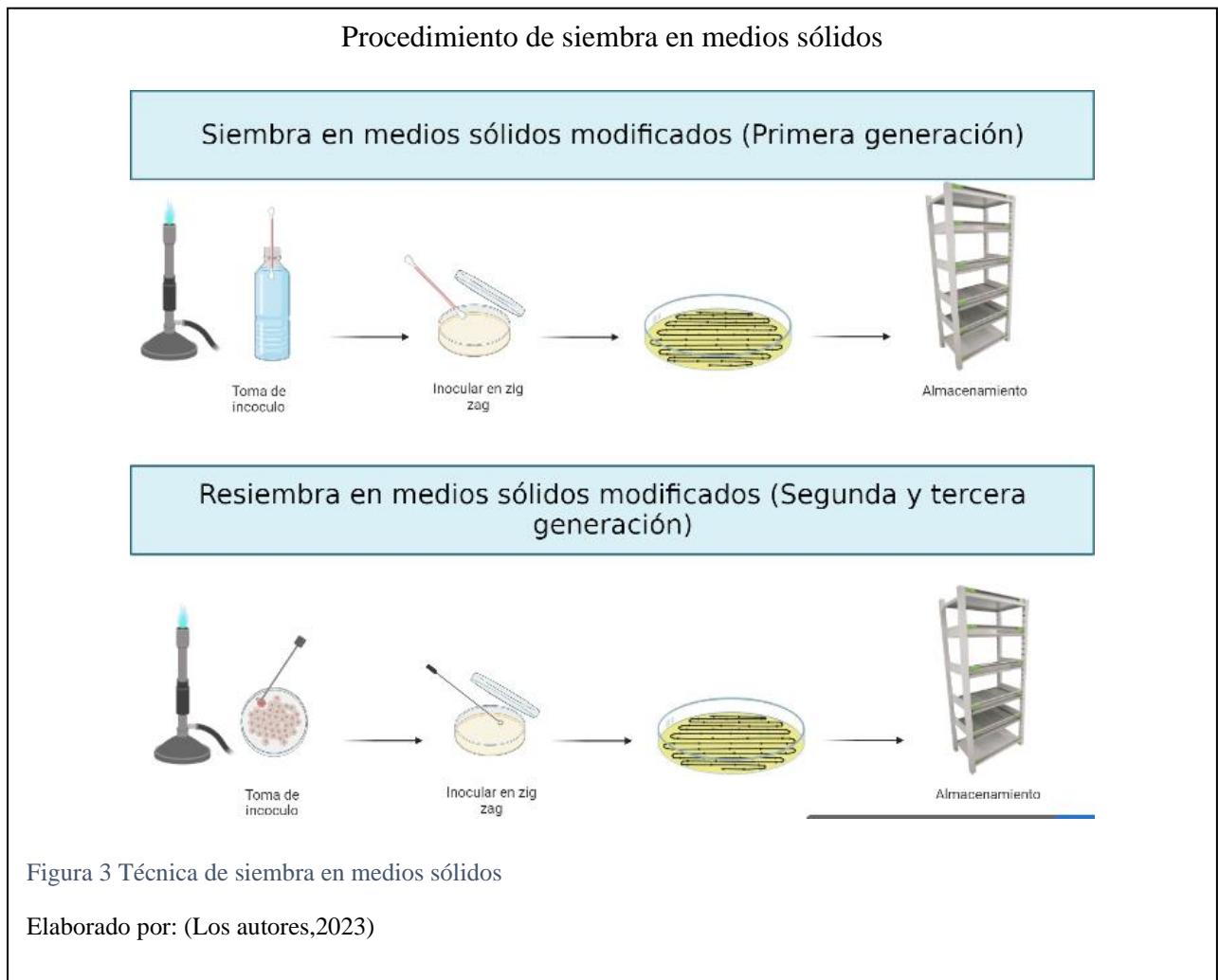
Transcurrido el tiempo de esterilización, en una cabina de flujo laminar, que fue proporcionada por el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UPS, se dispensó 25 mL del medio líquido en 5 cajas Petri para cada uno y se lo colocó en una refrigeradora dentro del cuarto frío a una temperatura de 14°C por unos pocos minutos hasta que los medios se solidifiquen (Bigurra et al., 2020). La figura 2 presenta el resumen de la metodología para la preparación de los medios.

### 3.3 Siembra en medios de cultivo modificados

Para el primer inóculo de las muestras micro algales se utiliza hisopos de algodón estériles, los cuales se humedecieron con la muestra y se sembraron mediante la técnica de agotamiento por estriado, realizando movimientos en forma de zigzag dentro de la cámara de flujo laminar, junto a mecheros de alcohol, las placas fueron sembradas por triplicado en cada uno de los medios modificados:

Artesanal, Bristol, RM y BG11, respectivamente. Las cajas Petri sembradas y selladas con parafilm, se colocaron en una estantería a temperatura ambiente, iluminadas con lámparas plasma de luz blanca.

Para la resiembra de las siguientes generaciones, se continuó realizando la técnica de estriado, utilizando un asa metálica de siembra para mayor precisión al tomar las colonias. La figura 3, presenta el procedimiento empleado para la siembra en medios sólidos de primera, segunda y tercera generación.

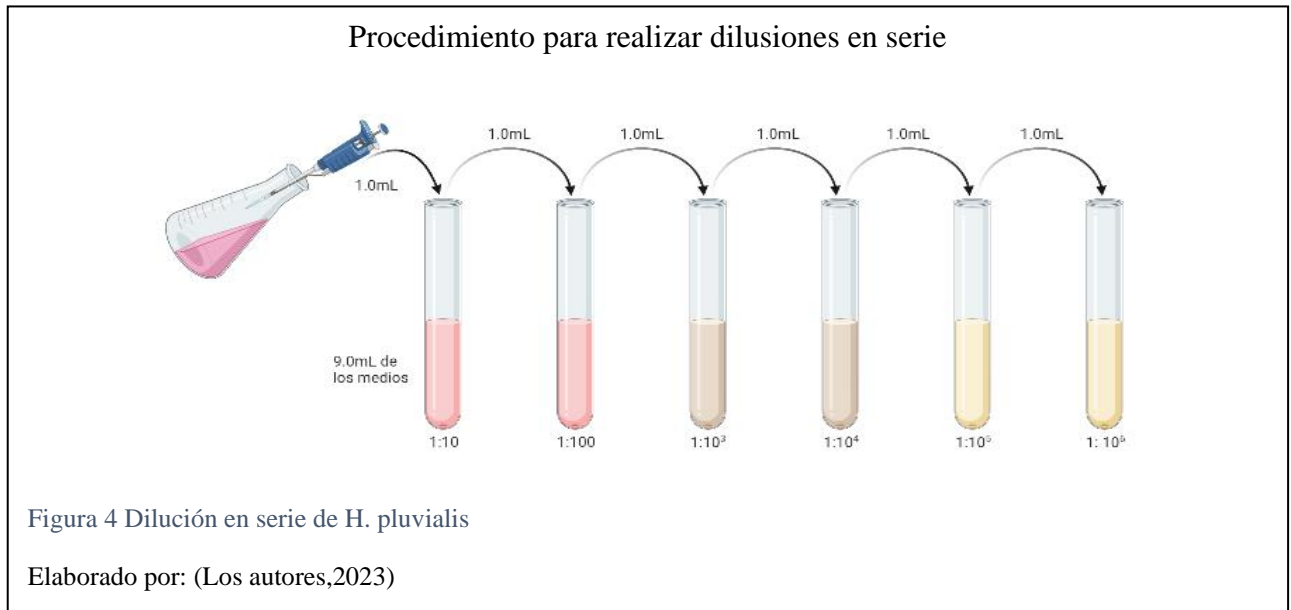


### 3.4 Purificación en medios líquidos.

En lo que se refiere a purificación de microalgas, el método que en un inicio se planeó seguir era la dilución en serie en cultivo líquido realizado por Mora et al. (2005) en la que se menciona que se tiene que volver a preparar todos los medios, pero sin agregar agar. Para comenzar se preparó 100 mL de los cuatro medios y se toman 9 mL de cada uno para colocarlos en seis tubos diferentes para

cada ensayo, luego se toma 1 mL de la muestra original y se la vierte dentro de los tubos para luego ser homogenizados (Ver figura 4).

### 3.5 Siembra en medios líquidos



La figura 5, muestra el procedimiento para la siembra de medios líquidos, la cual se realizó en un campo estéril con mecheros de alcohol y equipo de protección personal, como guantes, cofia, mandil y mascarilla, se inició tomando con un asa metálica las colonias de *H. pluvialis*, de la placa de medio sólido correspondiente a la primera generación, se escogieron las colonias más aisladas y solamente las que tuvieran un tono rojizo, y rápidamente se inoculó en el medio directamente, finalmente se cerraron los tubos de ensayo con tapa rosca y se colocó en una gradilla, en la misma estantería que las placas de medio sólido, donde permanecieron expuestos a las lámparas de luz blanca por un periodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con el objetivo de que estos generen biomasa.



### Procedimiento de siembra en medios líquidos en tubos.

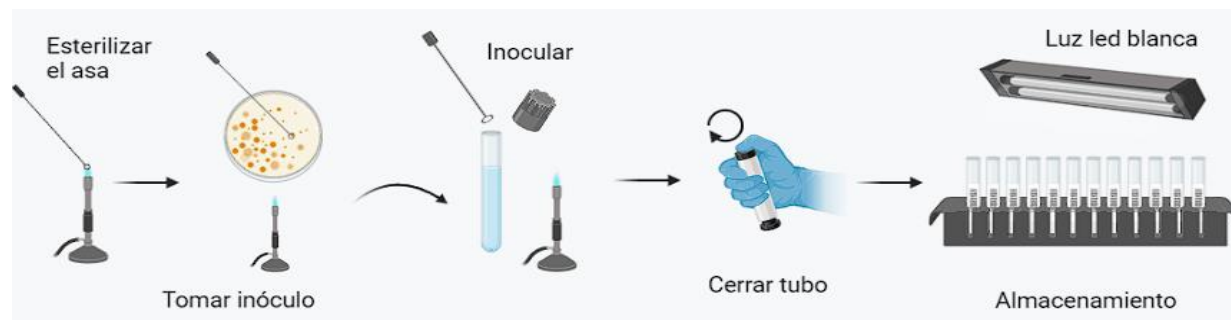


Figura 5 Técnica de siembra en medios líquidos para tubos.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

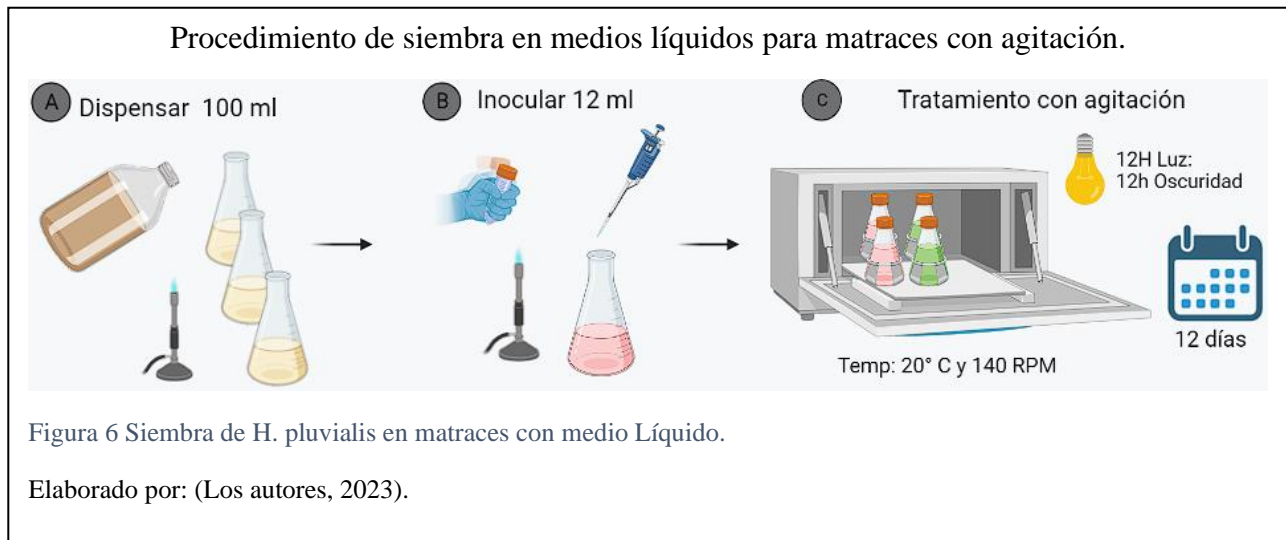
### 3.6 Tratamiento en Matraces

La figura 6, resume los pasos para el tratamiento de matraces, en donde se parte del material obtenido del aislamiento y la purificación, descrita en pasos previos, lo primero fue nuevamente preparar medios de consistencia líquida de los cuatro medios modificados propuestos; más adelante, se reguló su pH, entre 6 a 8, valor recomendado bibliográficamente en apartados anteriores, luego de esto, se dispuso dentro de una cabina de flujo la cantidad de 100 mL por matraz, se planteó hacer tres replicas por cada medio modificado, dando un total de doce unidades experimentales.

A continuación, dentro de una cabina de flujo, en condiciones de asepsia adecuadas se tomaron 2 mL de la solución de *H. pluvialis* donde se había encontrado mayor crecimiento y adaptación de esta, todos los matraces fueron cerrados lo más herméticamente con tapones de algodón estéril y una capa externa de papel aluminio.

Finalmente, se colocaron las unidades experimentales dentro un agitador continuo, programado con el tratamiento a evaluar, que comprendió tres características principales, temperatura de 20° C, velocidad de agitación de 140 rpm y para la iluminación, se colocó una lámpara de luz led blanca adaptada a un timer, el cual fue programado para permitir 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad diaria sobre los ensayos mientras estos se agitaban durante 24 horas por 12 días.

El objetivo del establecimiento de este ensayo fue, evaluar el crecimiento y desarrollo de *H. pluviialis*, dentro de cada uno de los medios.

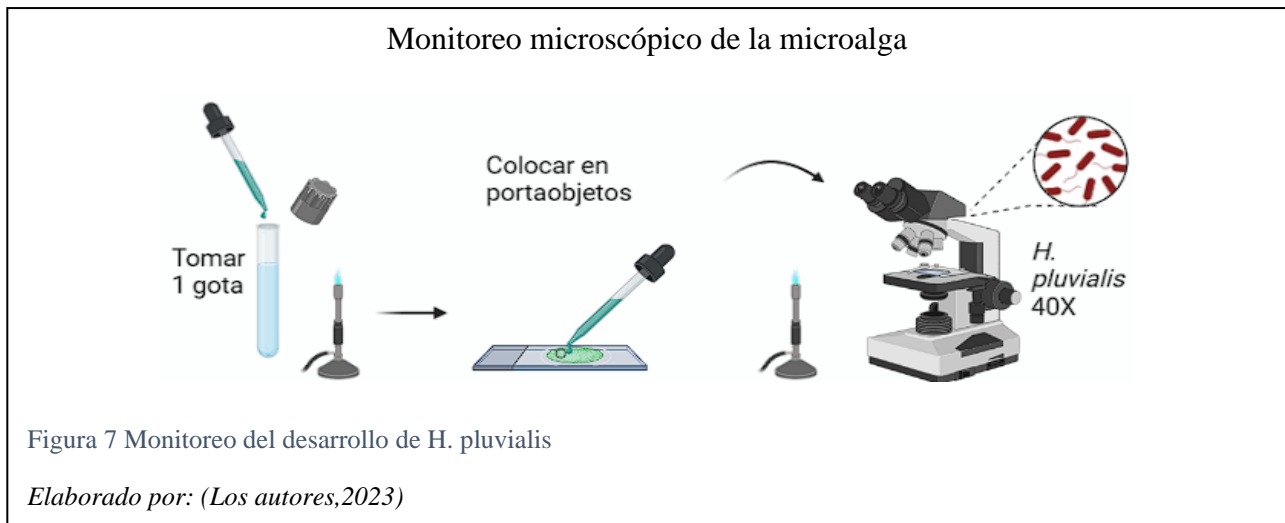


### 3.7 Seguimiento del desarrollo de la microalga

Para el caso de los medios sólidos y como se puede observar en la figura 7, se realizó monitoreos tomando muestras al cabo de 15 días luego de su siembra para comprobar que *H. pluviialis* creciera y poder verificar su morfología en dicho medio. Utilizando un asa bacteriológica y realizando delicados toques en las colonias que se veían aisladas y tuvieran el característico color rojizo, se dispuso un portaobjetos donde se depositó la muestra obtenida con el asa y luego se colocó una gota de agua destilada sobre la muestra, sobre esto se hizo caer suavemente el cubreobjetos que repartió la muestra de mejor manera. Esto se observó con ayuda del microscopio óptico con un aumento de 40X y en un campo previamente desinfectado para evitar la contaminación de los medios.

En los medios de consistencia líquida, se realizó el monitoreo, homogenizando la muestra dentro del tubo, se tomó una muestra del medio con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó una gota de la solución en un portaobjetos, cuidadosamente se sobrepuso un cubreobjetos, luego esta placa se llevó al microscopio donde se enfocó con el lente objetivo de 40X, aquí se pudo visualizar la fase en la que *H. pluviialis* se encontraba. Este procedimiento se realizó la primera vez a los 15 días de haberse inoculado y más adelante con frecuencia de una vez por semana, para llevar un control, cabe mencionar que todo este proceso se ejecutó la desinfección de la mesa con alcohol y utilizando

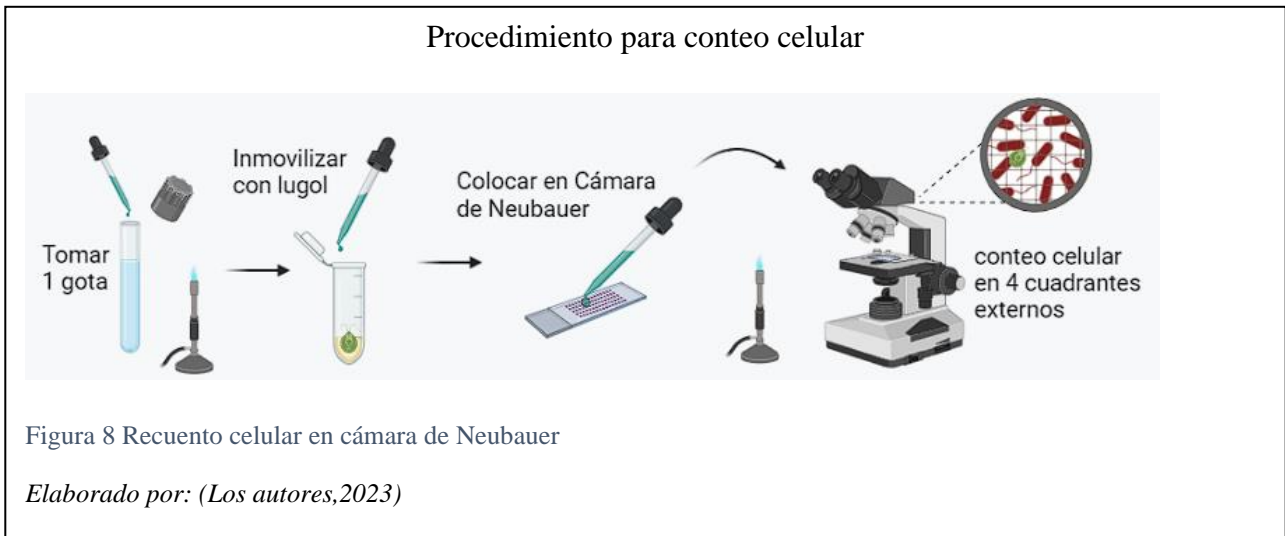
mecheros a gas para evitar el ingreso de contaminantes u otras especies de microalgas al interior de los tubos.



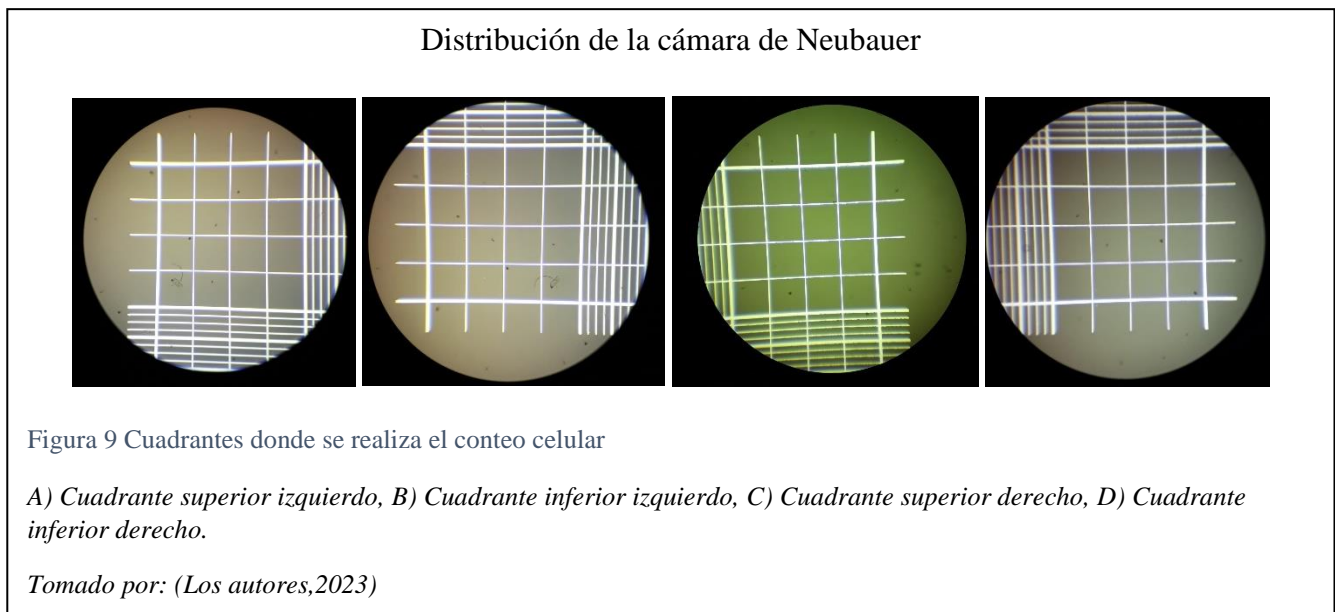
### 3.8 Recuento celular en cámara de Neubauer

El conteo de células de *H. pluvialis* se ejecutó empleando la cámara de Neubauer, en este caso no se realizaron diluciones ya que el contenido de biomasa de la microalga tuvo un desarrollo menos acelerado, a comparación de otras metodologías (Pavon, 2018), donde se recomienda hacer hasta un número de  $10^6$ . Por lo tanto, en un lugar desinfectado previamente con alcohol al 70%, en presencia de mecheros a gas y como se indica en la figura 8 se empieza tomando muestras de las cajas Petri y de los medios líquidos y colocando en un tubo una gota de la muestra y una gota del reactivo Lugol, esto con el propósito de inmovilizar las células de *H. pluvialis* las cuales poseen flagelos característicos de la fase vegetativa y permiten su movimiento lo que hubiera podido dificultar el conteo más adelante; posteriormente se coloca el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer, este debe ser posicionado de tal manera que cubra las dos casillas, es decir, en el centro de la placa, lo siguiente es colocar con la ayuda de una pipeta o gotero en uno de los extremos de la cámara y dejar

que la muestra suba por capilaridad, se debe esperar un minuto hasta que las células algales se asienten para llevar la placa al microscopio.



Una vez transcurrido el minuto, llevamos la cámara de Neubauer cargada con la muestra a la platina del microscopio y enfocamos con el objetivo 10X los cuadrantes que se deben localizar para el conteo, estos son los cuatro de los externos que se observan en la figura 9, y luego se observará con el lente de aumento de 40X, para realizar el conteo.



### 3.9 Cálculo de la densidad celular

Los resultados del número de células microalgales de cada observación se deberán anotar para luego calcular la densidad celular utilizando la siguiente operación:

$$DC = \frac{N}{4} \times 10^4 \times Fd$$

Donde:

N= Número de células contadas dividido para 4 correspondiente al número de cuadrantes donde se ha contado.

$10^4$ = Valor constante por el volumen de la cámara

Fd= el factor de dilución que sea utilizado para la muestra.

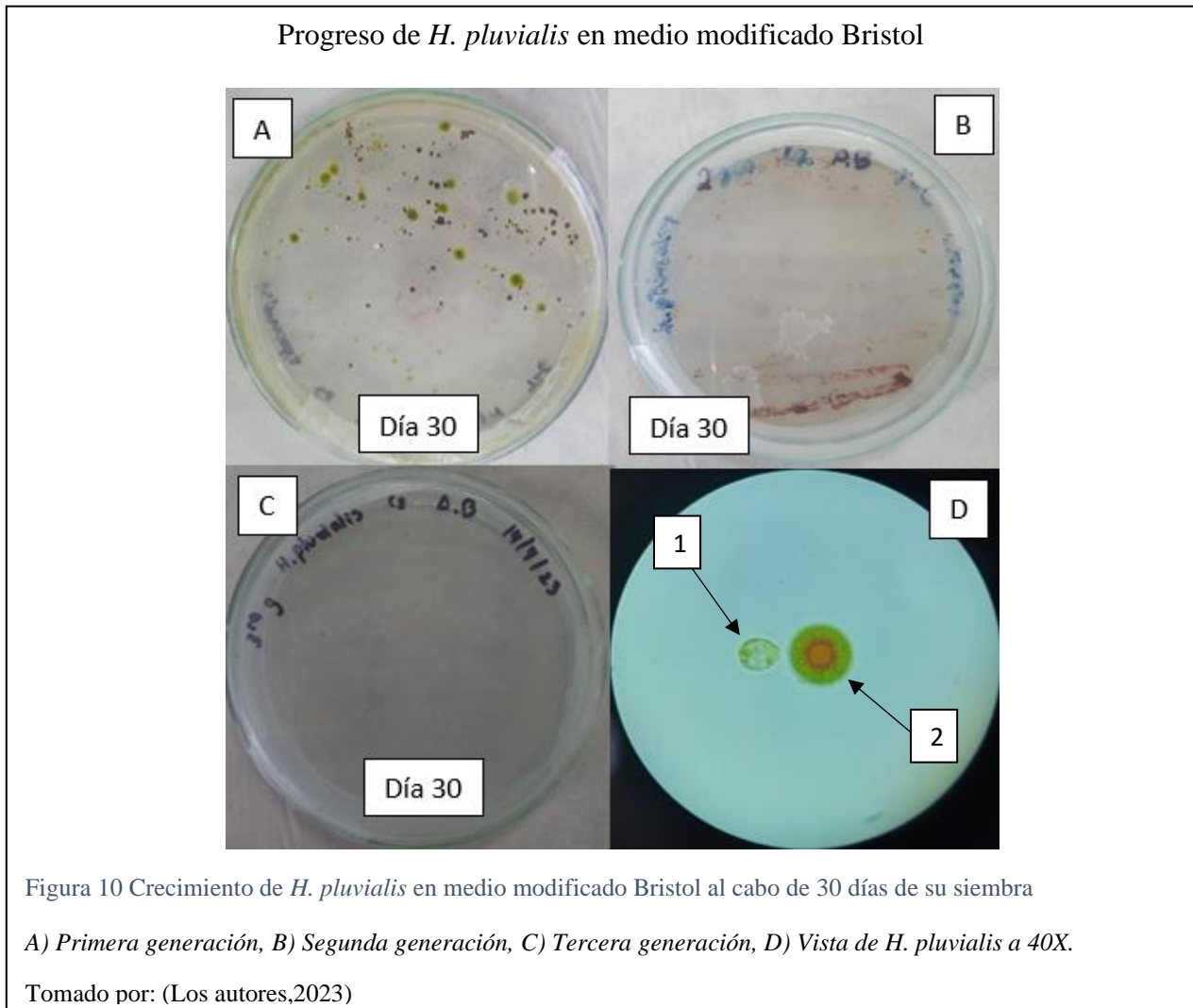
### 3.10 Análisis estadístico e interpretación de datos

Para la elaboración de gráficas de los datos obtenidos del cálculo de la densidad celular en los medios probados, se utilizará el software estadístico Minitab versión 2021.

En cuanto a la interpretación de resultados, se utilizará la herramienta de análisis de varianza ANOVA de un solo factor con una significancia de 0.05, para evaluar el crecimiento de la microalga en los cuatro medios de cultivo montados, con la implementación de tres replicaciones por cada tratamiento, dando un total de doce unidades experimentales en matraces y veinte en tubos. Además, se aplicará la prueba de Tukey, la cual nos facilita conocer de ser el caso los tratamientos que presentan diferencias.

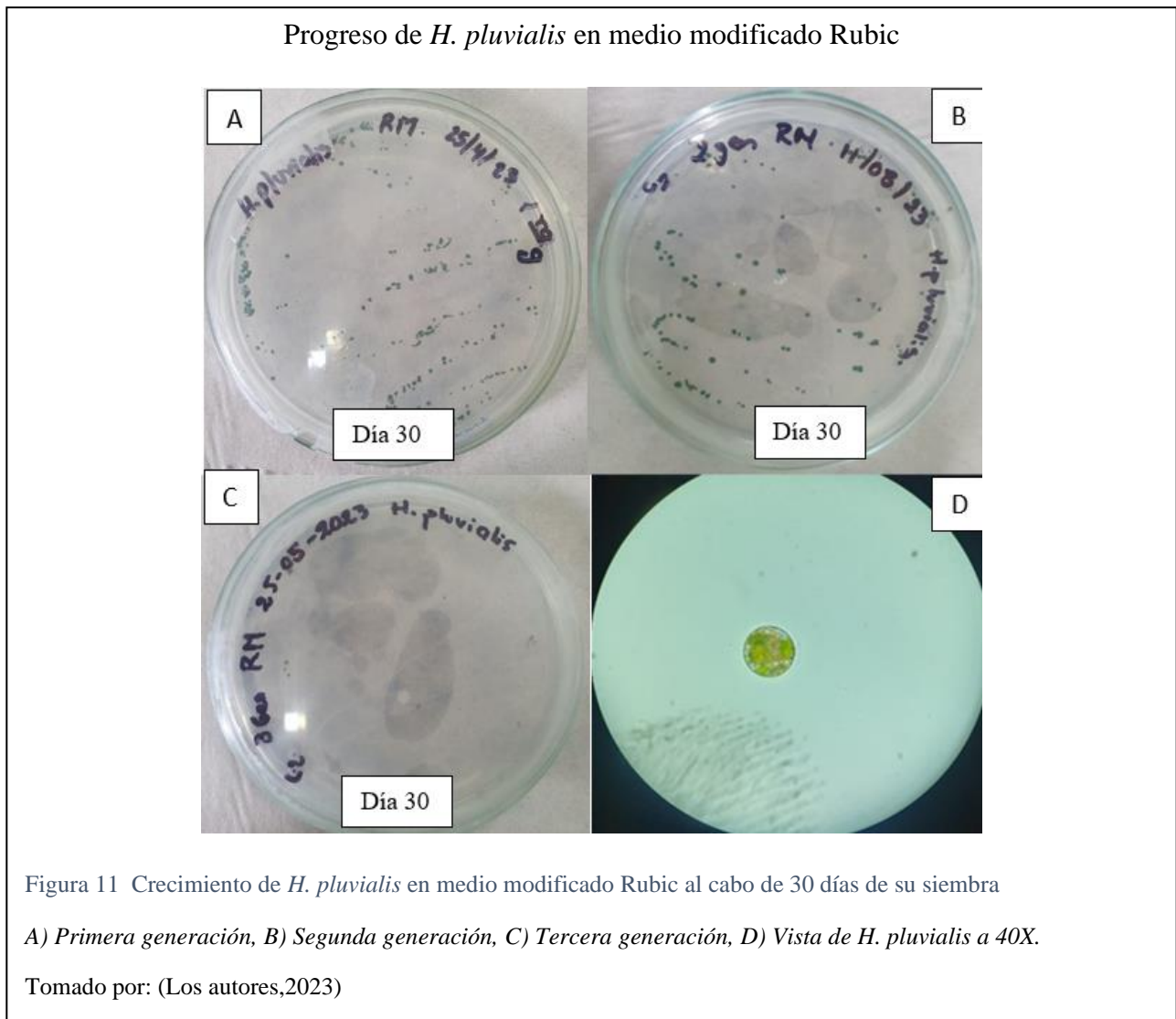
## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Crecimiento y aislamiento



En lo que respecta al crecimiento en el medio modificado Bristol, la imagen A dentro de la figura 10, muestra un crecimiento moderado al término de 30 días de *H. pluvialis*, además se observa la presencia de otra microalga que, en base a lo publicado por Johnson (2019) se trata de *Chlorella vulgaris*, la que tiende a contaminar y a dificultar el crecimiento de *H. pluvialis* a razón de que esta se alimenta de los micronutrientes que la microalga de interés necesita para su desarrollo. La imagen B de la figura 10 muestra que 30 días después de la resiembra existen resultados favorables en la segunda generación del medio, logrando un crecimiento y aislamiento visible de la microalga deseada. En cuanto, a la imagen C también de la figura 10, se pone en evidencia que el seguimiento de la tercera generación del medio Bristol modificado no presenta ningún crecimiento de la microalga,

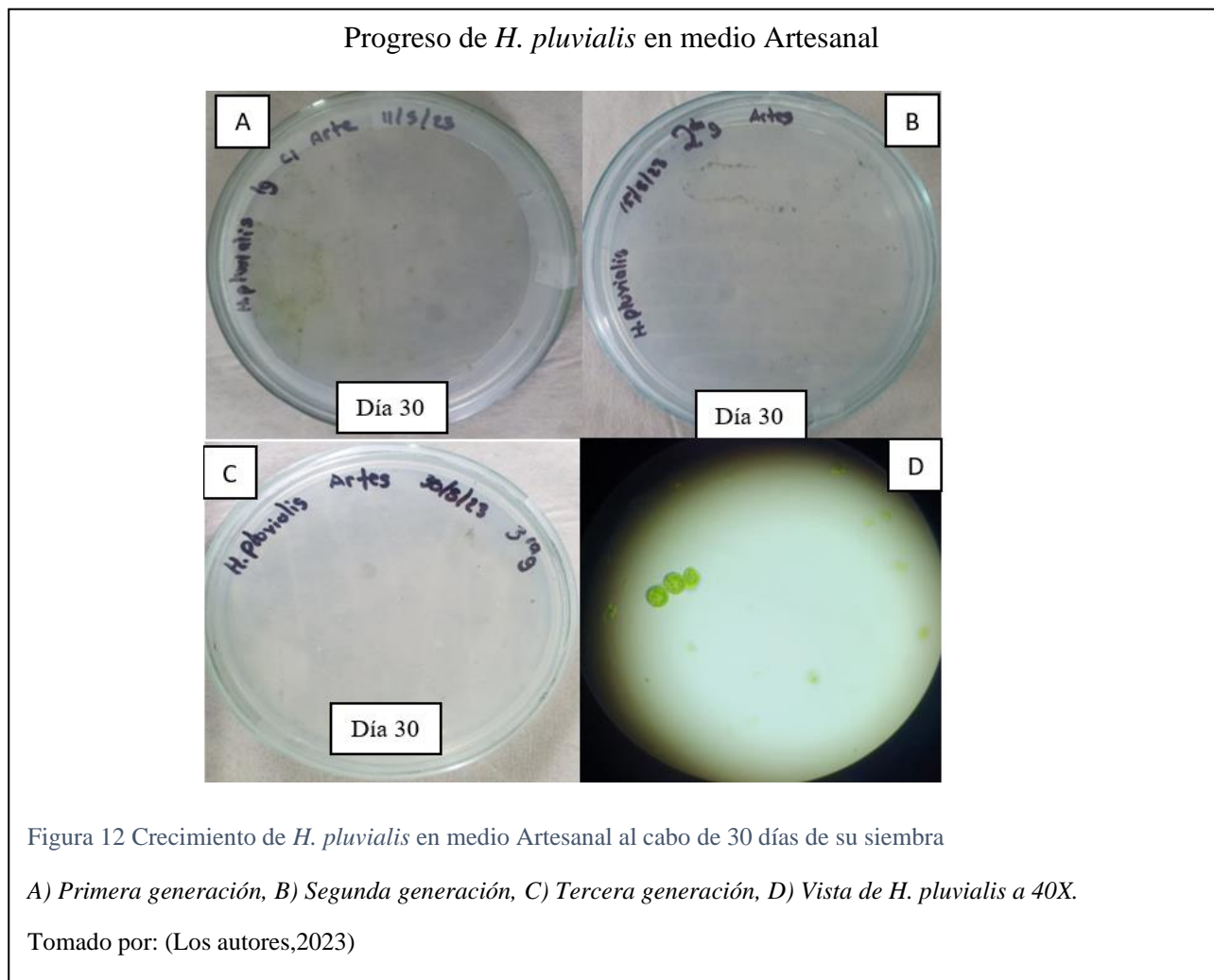
en la publicación de Salazar et al. (s.f). se hace mención que una de las causas para ello es un error de manipulación del asa cuando se realiza la siembra. Por último, en la imagen D que también corresponde a la figura 10, se muestra bajo un lente de 40x la presencia de *H. pluvialis* en la segunda generación, en la que la que la flecha número 1 indica que una de ellas se encuentra en la fase vegetativa, mientras que, la flecha número 2 muestra que la otra microalga de *H. pluvialis* se encuentra en una fase de transición.



En la imagen A perteneciente a la figura 11, se evidencia que al transcurrir 30 días de la siembra y con las mismas condiciones del medio Bristol (temperatura y luz), se visibiliza un crecimiento moderado en el medio Rubic de primera generación de colonias color verde. Asimismo, en la imagen B también de la misma figura, se observa al cabo de 30 días un crecimiento parecido a su antecesor. Por



contraparte y como se observa en la imagen C de la misma figura 11, se puede notar que al realizar otra resiembra a partir del medio de segunda generación esta contiene un moderado crecimiento, tal cambio se debe a dos factores como son la cantidad de luz administrada y el tener una sola fuente de nitrógeno que según Gómez et al. (2019) en su ensayo de determinación de astaxantina a partir de cultivo de *H. pluvialis* destaca que para tener un crecimiento voluminoso y en menos días se debe emplear más de una fuente de nitrato para aumentar la capacidad de división celular de la microalga como también controlar la administración de la fuente de luz para que así la microalga pueda efectuar su ciclo celular. Por último, en la imagen D correspondiente a la figura 10, se muestra bajo un lente de 40x que *H. pluvialis* en primera generación se encuentra en la fase de palmela debido a la disponibilidad de nutrientes que este medio presenta y a su lento consumo (Granda,2015).





Se puede decir que la imagen A concerniente a la figura 12, muestra un crecimiento de *H. pluvialis* no muy voluminoso para el medio de primera generación bajo las condiciones de luz led blanca y a temperatura ambiente de la ciudad de Quito (20-21°C). Subsecuentemente, en la imagen B de la figura 12, se observa el crecimiento más pronunciado de *H. pluvialis* en su segunda generación al cabo de 30 días después de la siembra con muestras de la primera generación y bajo la presencia de las condiciones previamente mencionadas. De similar manera en la imagen C de la figura 12, indica que la tercera generación del medio artesanal al cabo de 30 días bajo las mismas condiciones exhibe un leve desarrollo de la microalga. Así pues, en la imagen D referente a la figura 12, se evidencia bajo un lente de 40x que *H. pluvialis* de la primera generación se encuentra en la fase vegetativa o macrozoote. Todo ello, se debe a que la urea proporciona una buena fuente de nitrógeno para *H. pluvialis* en comparación de otros reactivos, además de un buen aumento en la biomasa al cabo de 15 días (Wang et al., 2019). En contraposición, el uso de sal en grano al no ser un compuesto de grado reactivo inhibió al desarrollo de la microalga, es por ello no hubo crecimiento pronunciado en primera y tercera generación.



Las imágenes A, B y C relacionadas a la figura 13, estas no presentaron crecimiento a simple vista ni con relación al crecimiento y aislamiento esto se lo realizó 30 días después de cada siembra, mostrando que la microalga para el medio modificado BG11 nunca se evidenció ni visual ni microscópicamente, prueba de ellos son las imágenes A, B y C de la figura 12, donde se pone en

evidencia la no presencia de *H. pluvialis*. Según se menciona, en el trabajo elaborado por Bardales et al. (2020) un cambio abrupto de las condiciones del medio de cultivo, en este caso una fallida calibración de pH y altas cantidades en la composición del medio son de las principales causas para la inhibición de microalgas, ya que para que haya un aumento en la densidad celular el medio modificado BG11 debería contar con un valor de pH de 6,5-7,1 y la cantidad de ácido bórico no debería sobrepasar el valor 1 g/L, como en los ensayos realizados por Sakarika y Kornaros (2016), donde utilizaron el mismo medio a la concentración mínima del mismo.

## 4.2 Conteo celular de *H. pluvialis* y evaluación morfológica en tubos

### 4.2.1 Medio Bristol modificado

El conteo se realizó en cada una de las repeticiones, con un intervalo inicial de una vez por semana hasta observar cambios en el medio líquido, más adelante se realizó con una frecuencia de tres veces por semana. Se pudo observar el resultado del conteo de celular de *H. pluvialis* en medio Bristol, este medio logró los niveles más altos de crecimiento celular, como se detalla en la tabla 2. En este caso los resultados fueron concordantes con trabajos como el de Niño et al. (2017) y Camacho et al. (2019) quienes concluyeron que el medio basal Bristol es uno de los medios más adecuados para el cultivo de *H. pluvialis*. Adicional a esto, en la tabla 3, se muestra el registro de los cambios morfológicos de *H. pluvialis* durante 21 días de crecimiento, como se puede observar a partir del tercer día de ser inoculada, esta microalga presenta indicios de acondicionamiento con el medio Bristol modificado, encontrando células en fase de aplanospora con característico color rojizo convertirse en células de transición a fase verde nuevamente, es decir abandonando su estadio supervivencia frente al estrés. Las observaciones microscópicas de *H. pluvialis* en los días 9 al 18, demuestran presencia de flagelos y movimiento notorio en las células, además se observan segregaciones protéicas que pegan sus células formando conglomerados cada vez más numerosos, finalmente, en el seguimiento hasta el día 21, se puede encontrar células de *H. pluvialis* en proceso de división, como en fase de palmela. Estos cambios en la morfología de la microalga concuerdan con lo obtenido por Gonzales (2004), quien utilizó en su cultivo un pH entre 4.0 a 6.0 obteniendo  $2,10 \times 10^5$  cel/mL, este autor concluye que el

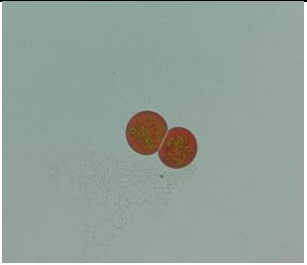
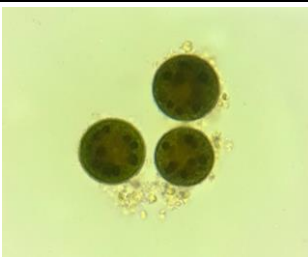


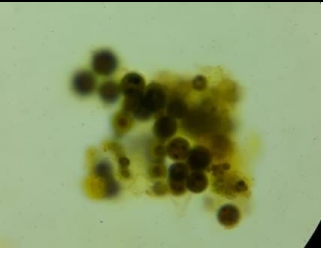

pH del medio influye en tres aspectos dentro del medio de cultivo, modifica la tasa de crecimiento, produce cambios morfológicos y como un inductor de estrés fisiológico, por lo que se determina que en este medio al tener un pH dentro de 6,8 favorece al crecimiento de *H. pluvialis*.

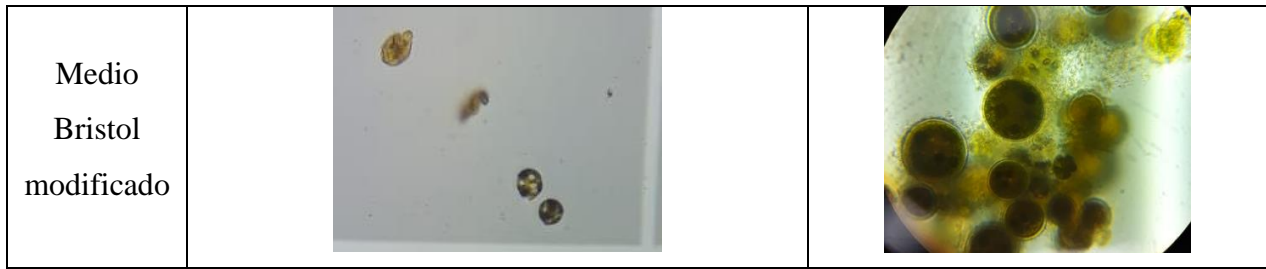
Tabla 2 Conteo celular cel/mL en medio Bristol en tubos.

Bristol				
Días/Repetición	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
1	72500	10000	5000	25000
3	412500	187500	155000	445000
6	105000	7500	50000	70000
9	25000	42500	0	32500
12	25000	402500	75000	25000
15	30000	52500	122500	0
18	110000	255000	97500	132500
21	60000	160000	42500	212500
<b>Sumatoria</b>	<b>840000</b>	<b>1117500</b>	<b>547500</b>	<b>942500</b>

Elaborado por: (Los autores,2023)

Tabla 3 Morfología de *H. pluvialis* en medio Bristol modificado durante 21 días en tubos.

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en tubos			
Días de cultivo	1	3	6
Medio Bristol modificado			
Días de cultivo	9	12	15
Medio Bristol modificado			
Días de cultivo	18		21



Elaborado por: (Los autores,2023)

#### 4.2.2 Medio Rubic modificado

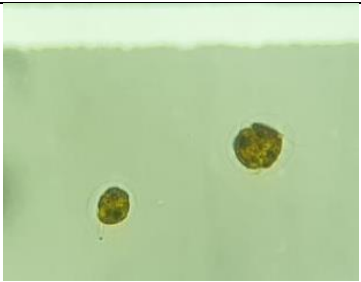
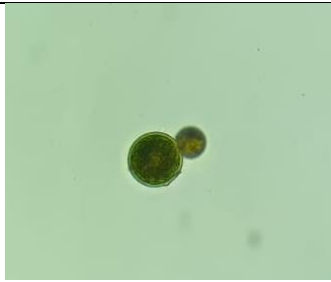
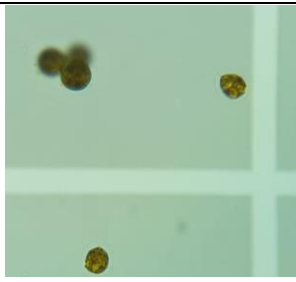
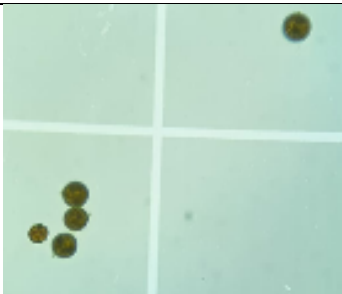
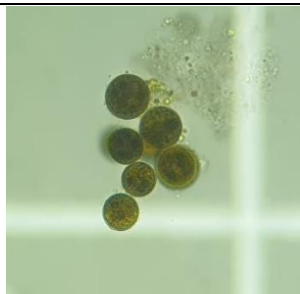
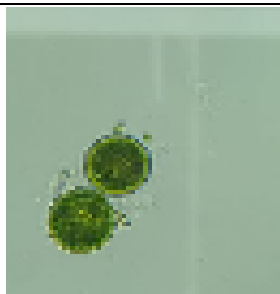
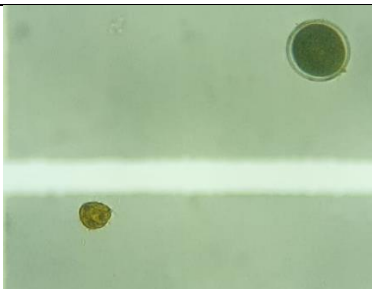
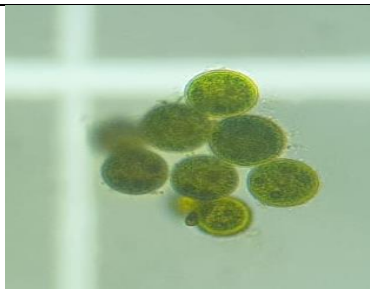
El conteo de células que se describe en la tabla 4, obtenido en medio RM arrojó menos crecimiento con un promedio de  $3,75 \times 10^4$  cel/mL. Al contrario de los resultados reportados por Niño et al. (2017), donde se destaca al medio Rubic por dar los mejores resultados tanto en crecimiento y producción celular como en generación de astaxantina con un promedio de  $7,5 \times 10^5$  cel/mL. Esto presuntamente se deba a la elevada cantidad de  $KNO_3$  que el medio modificado ensayado presenta en su composición pues este no debería superar los 100 mg/L (Niño et al., (2017)). Por otro lado, en la tabla 5 del medio Rubic modificado se demuestra que en el transcurso de 21 días que duró el ensayo *H. pluvialis* nunca llegó a presentar su fase aplanospora característico por ser la que alberga astaxantina, esto se debió a que en este medio la microalga no fue sometida a condiciones de estrés, lo mencionado se respalda con lo publicado por Cuero et al. (2019) quienes hasta el día 24 solamente observaron que el crecimiento de sus colonias estaban en fase de zoospora y palmela, y no fue hasta el día 30 que estas cambiaron a la fase de transición.

*Tabla 4 Conteo celular cel/mL en medio RM en tubos.*

RM					
Días/Repetición	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5
1	5000	5000	7500	2500	2500
3	15000	10000	2500	10000	7500
6	15000	20000	47500	42500	22500
9	10000	27500	15000	87500	72500
12	77500	27500	30000	145000	42500
15	85000	27500	27500	25000	15000
18	120000	50000	25000	112500	42500
21	45000	20000	50000	62500	45000
Sumatoria	<b>372500</b>	<b>187500</b>	<b>205000</b>	<b>487500</b>	<b>250000</b>

Elaborado por: (Los autores,2023)

Tabla 5 Morfología de *H. pluvialis* en medio RM modificado durante 21 días en tubos.

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en tubos			
Días de cultivo	1	3	6
Medio RM			
Días de cultivo	9	12	15
Medio RM			
Días de cultivo	18		21
Medio RM			

Elaborado por: (Los autores,2023)

#### 4.2.3 Medio Artesanal

En el medio Artesanal, los resultados del conteo de células de *H. pluvialis* fueron mayores al medio Rubic, Sin embargo, el crecimiento se fue evidenciando al cabo de aproximadamente 10 días. Los resultados reportados del crecimiento celular fueron menores a los esperados, ya que en su composición se le agregaron fuentes de nitratos como la urea y de sodio proveniente de la sal en grano, elementos que han sido reportados como parte de los nutrientes básicos para el desarrollo de microalgas de otros ensayos como el de Rolón e Ibáñez (2021), quienes realizaron una estimación de

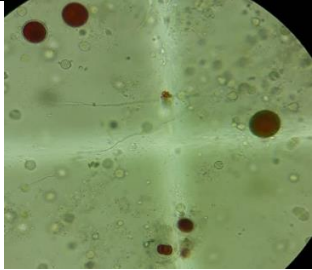
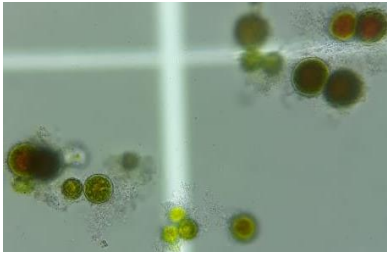

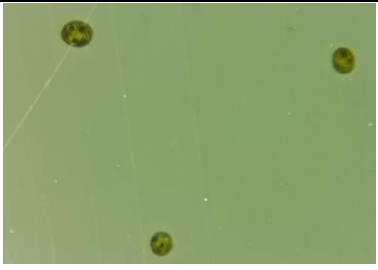
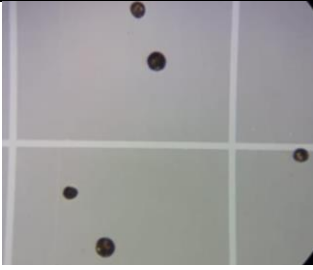

un medio a base de urea demostrando que este fue uno de los mejores tratamientos inclusive en lo que se refiere a costos.

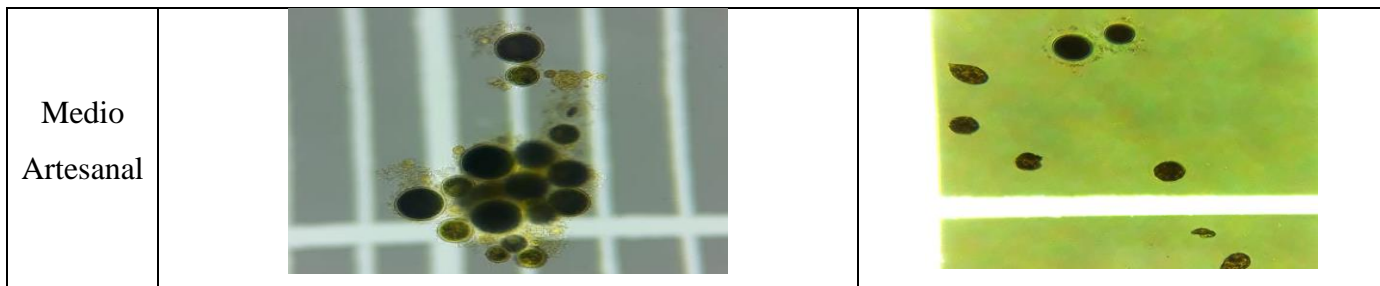
Tabla 6 Conteo Celular cel/mL en medio Artesanal en tubos.

Artesanal					
Días/Repetición	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5
1	42500	0	65000	0	52500
3	22500	2500	25000	7500	45000
6	2500	5000	72500	0	0
9	87500	107500	42500	80000	145000
12	100000	105000	17500	80000	165000
15	102500	137500	210000	12500	295000
18	132500	85000	117500	30000	157500
21	105000	170000	237500	107500	527500
Sumatoria	<b>595000</b>	<b>612500</b>	<b>787500</b>	<b>317500</b>	<b>1387500</b>

Elaborado por: (Los autores,2023)

Tabla 7 Morfología de *H. pluvialis* en medio artesanal durante 21 días

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en tubos			
Días de cultivo	1	3	6
Medio Artesanal			
Días de cultivo	9	12	15
Medio Artesanal			
Días de cultivo	18		21

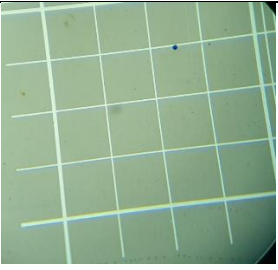
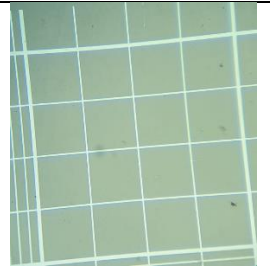
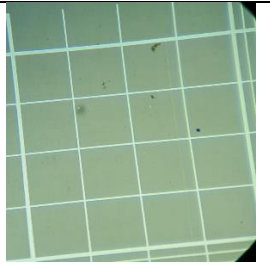
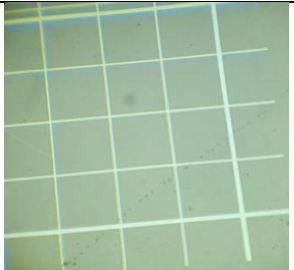
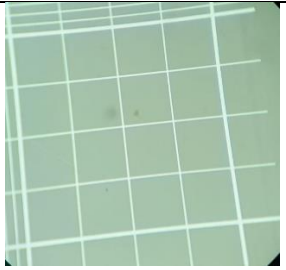
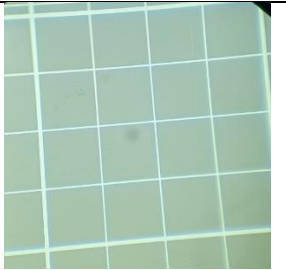


Elaborado por: (Los autores,2023)

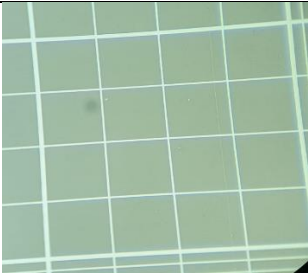
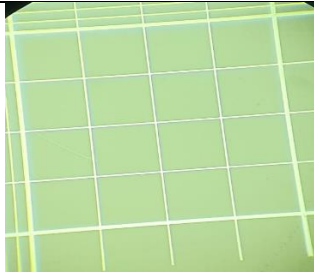
#### 4.2.4 Medio BG11

Como se muestra en la tabla 8, para el medio BG11, en el período de 21 días no se evidenció la presencia de la microalga. Algo que contrasta con trabajos previos como el de Imamoglu et al. (2007), donde obtuvieron una cantidad de producción de biomasa final al décimo día de su siembra de  $5.20 \times 10^5$  cel/mL. Por lo tanto, se considera que otras condiciones de cultivo pueden haber inhibido el crecimiento de *H. pluvialis*, tales como el pH, que pese a ser medido y regulado en la preparación del medio, existe la posibilidad de que se haya modificado, ya sea por el autoclavado del medio, la temperatura o por la estabilidad de la composición del medio.

Tabla 8 Morfología de *H. pluvialis* en medio BG11 modificado durante 21 días en tubos.

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en tubos			
Días de cultivo	1	3	6
Medio BG11M			
Días de cultivo	9	12	15
Medio BG11M			



Días de cultivo	18	21
Medio BG11M		

Elaborado por: (Los autores, 2023)


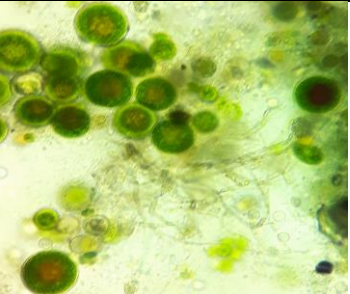
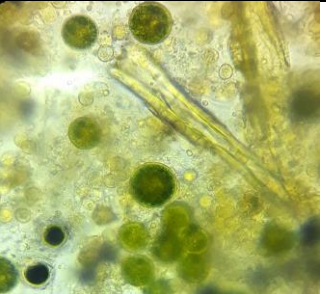
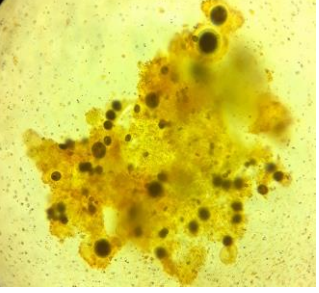
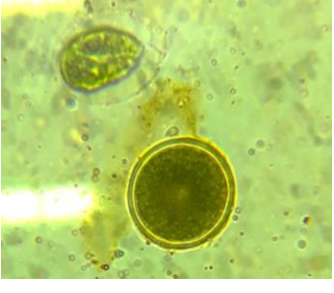
### 4.3 Conteo celular de *H. pluvialis* y evaluación morfológica en matraces con agitación.

#### 4.3.1 Medio Bristol modificado

El monitoreo realizado en el cultivo de *H. pluvialis* en medio Bristol en matraces, se pudo observar una rápida adaptación de las células de la microalga, a comparación de los otros medios probados, la primera semana luego de la siembra se observó que las células en fase de aplanospora con coloración roja característica de un estado de estrés, se fue tornando color verde, al término de los primeros 5 días posteriores al inóculo. Los elementos responsables de este efecto de rápida adaptación son similares a los obtenidos por Ramírez (2013), quien aplicó el medio Bristol en condiciones de agitación a 25°C y con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Se observó que la presencia de los elementos nitrógeno, sodio, magnesio son los ingredientes claves para que *H. pluvialis* presente un desarrollo rápido y adecuado con el fin de obtener alta tasa de crecimiento y división celular.



Tabla 9 Morfología de *H. pluvialis* en medio Bristol modificado durante 12 días en matraces.

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en matraces			
Días de cultivo	1	3	6
Medio Bristol modificado			
Días de cultivo	9		12
Medio Bristol modificado			

Elaborado por: (Los autores,2023)

### Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en medio modificado Bristol

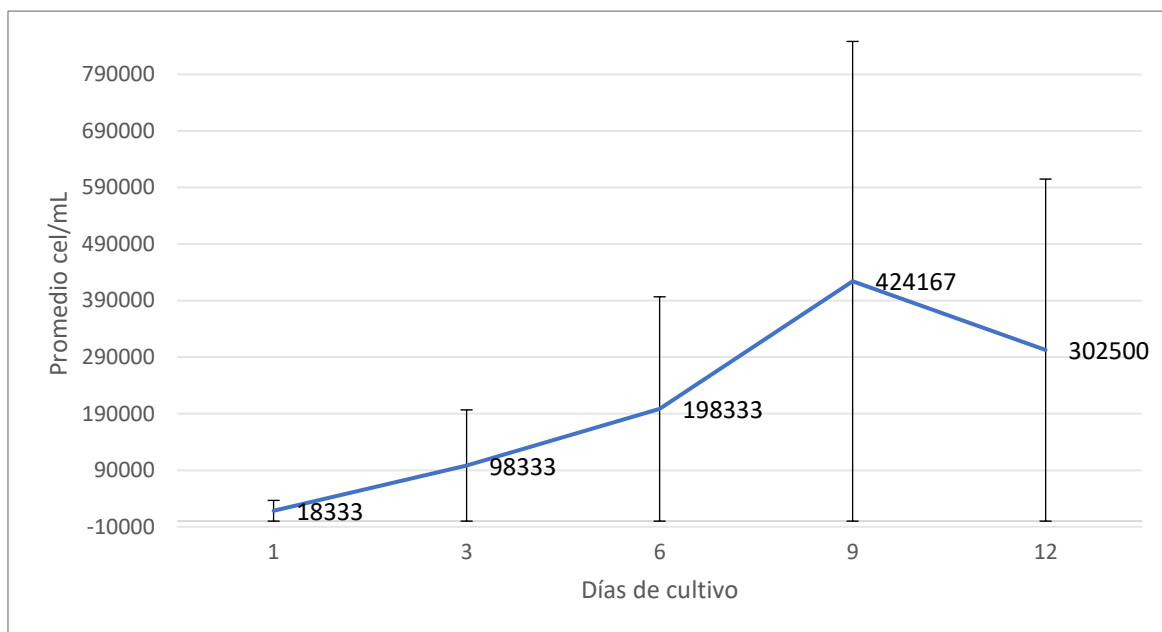


Figura 14 Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en el medio modificado Rubic después de 12 días de su siembra.

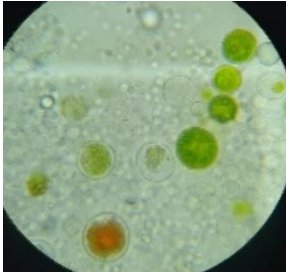

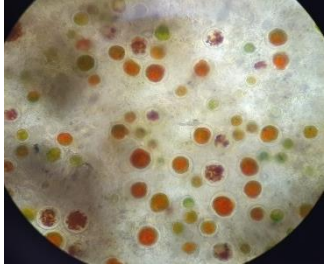
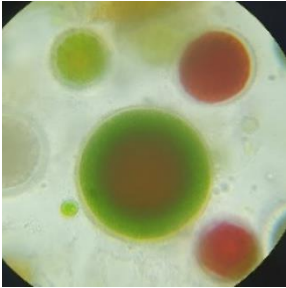
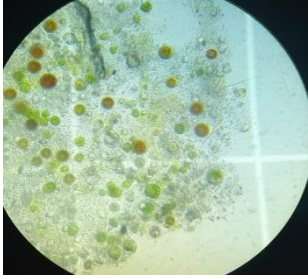
Elaborado por: (Los autores,2023)

#### 4.3.2 Medio Rubic modificado

En lo que respecta a la cinética de crecimiento para el medio Rubic modificado, esta se lo realizó al cabo de 12 días, tiempo en donde se hace un seguimiento y un conteo celular en la cámara de Neubauer. Como se observa en la figura 15, la tendencia de crecimiento de la microalga en los primeros cuatro días va en aumento, llegando a su máximo punto al noveno día con un total de 257500 cel/mL, para luego empezar a decaer. Estos resultados se sustentan por lo publicado por Imamoglu et al. (2007), en donde mencionan que al llegar al décimo día después de la siembra, el valor celular tiene levemente a decrecer, esto está relacionado con cambios en la temperatura, intensidad lumínica que un inicio fue de  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y luego de  $40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y del agotamiento de nutrientes. Para este caso experimental en concreto, el factor clave para que haya una menor cantidad de células fue la falta de una fuente lumínica después del noveno día, esta misma es la que le otorga a la microalga el poder de realizar actividades como son el crecimiento y metabolismo celular (Martínez et al., 2021). Lo previamente mencionado tiene relación con el cambio morfológico

que la microalga presento, dado que, y como se presenta en la tabla 10, al día 1 la microalga en su mayoría se la encontraba a en su fase de aplanospora y a medida que pasaron los días y con la presencia de luz artificial este cambio a su fase de palmela. Sin embargo, al llegar el noveno día y con el retiro de la luz, la microalga en su gran mayoría volvió a tornase con color rojo característico de la fase aplanospora, esto se verifica por lo reportado por Choi Y et al. (2011), los cuales concluyeron en su experimento que *Haematococcus pluvialis* en su fase verde tiende a crecer de manera exponencial cuando hay un nivel alto de intensidad lumínica, en cambio cuando se pierde esta fuente lo que abunda son las células en su estadio de roja (aplanospora).

*Tabla 10 Morfología de H. pluvialis en medio Rubic modificado durante 12 días en matraces.*

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en matraces.			
Días de cultivo	1	3	6
Medio Rubic modificado			
Días de cultivo	9		12
Medio Rubic modificado			

Elaborado por: (Los autores,2023)

### Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en medio modificado Rubic

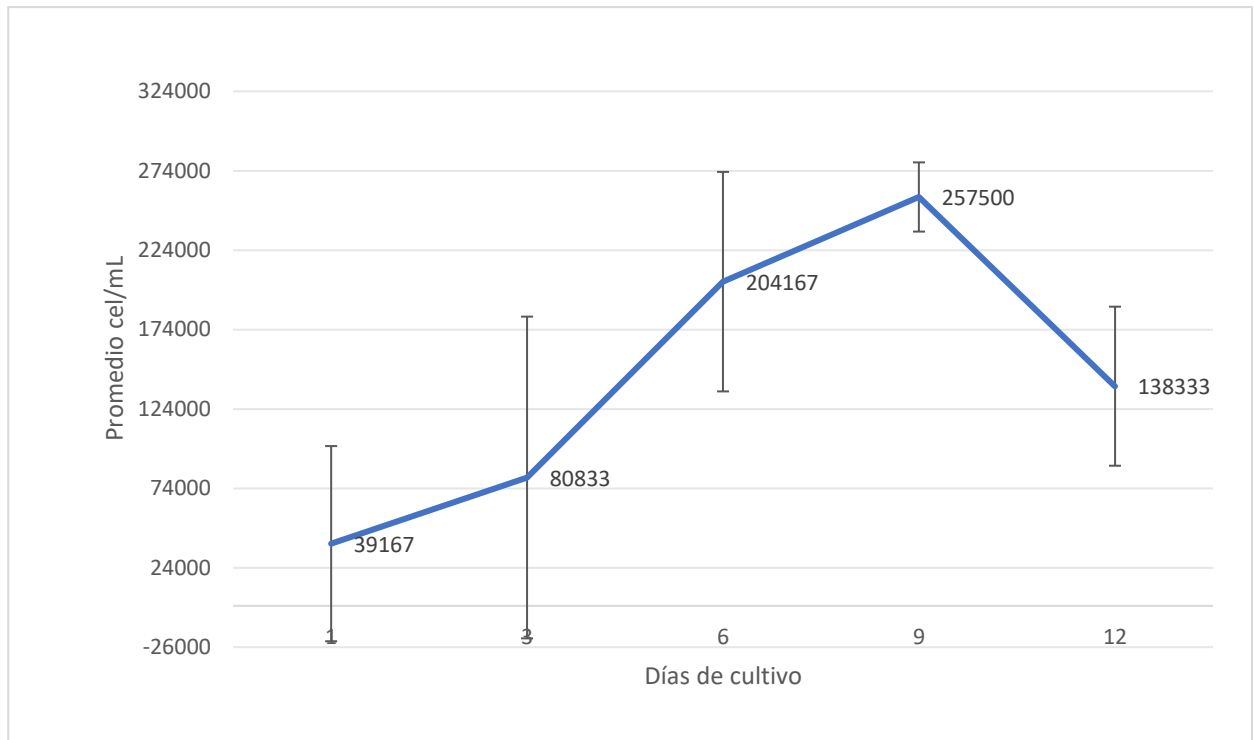


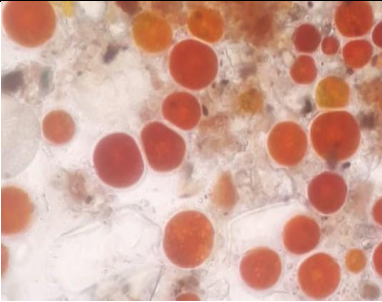
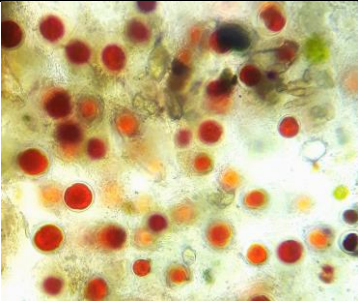
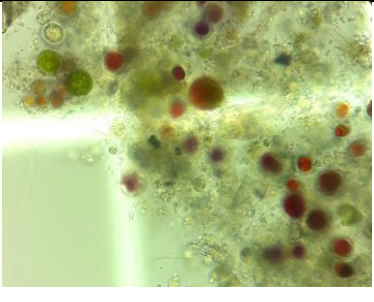
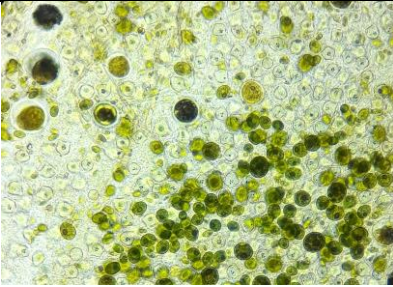
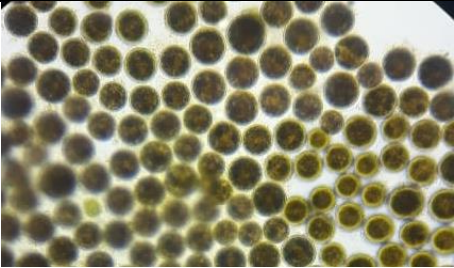
Figura 15 Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en el medio modificado Rubic después de 12 días de su siembra.

Elaborado por: (Los autores,2023)

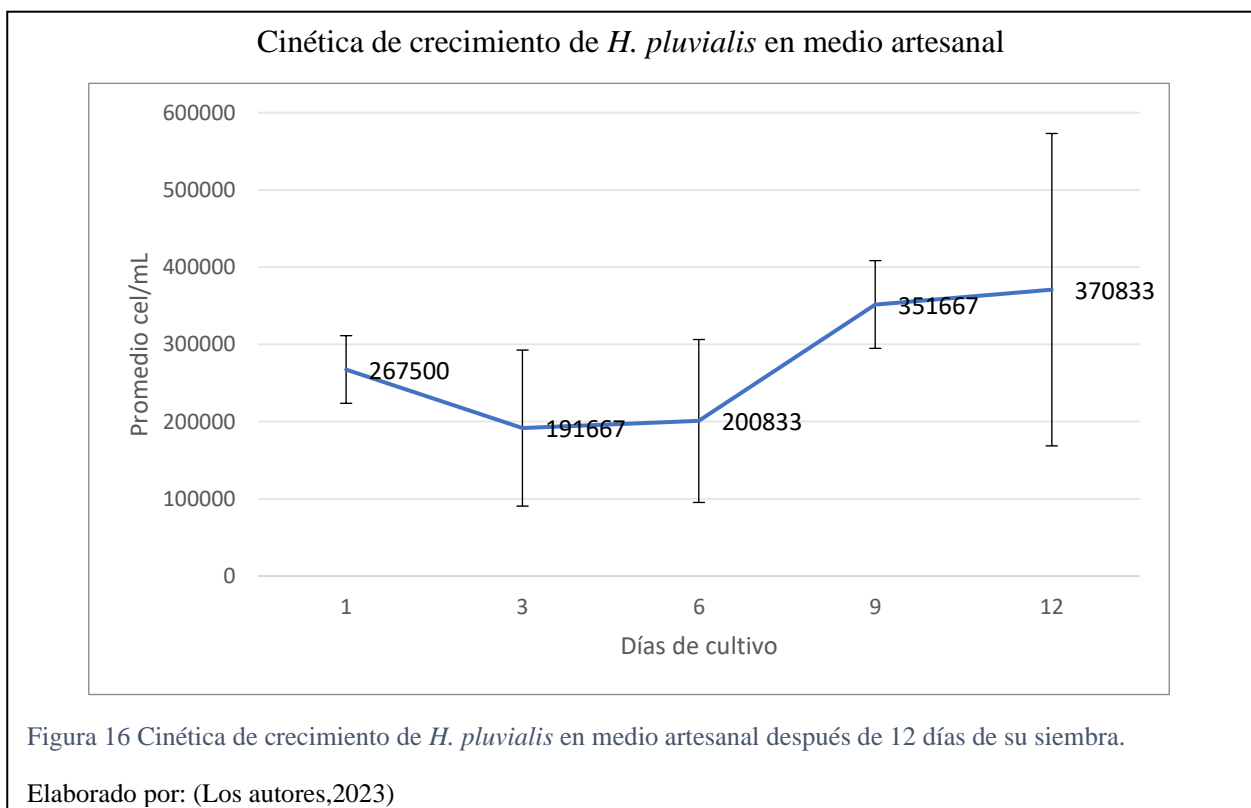
#### 4.3.3 Medio Artesanal

De acuerdo a los resultados obtenidos luego de un seguimiento de 12 días de la cantidad de células presentes en las unidades experimentales de *H. pluvialis* en el medio artesanal propuesto para este ensayo, la adaptación de la microalga de este medio se vio que fue en un tiempo más largo a comparación del medio Bristol, como se observa en la tabla 11, se ha registrado el cambio morfológico de *H. pluvialis* donde se puede observar el tiempo más prologado que esta microalga requiere para adaptarse a este medio, del día 1 al 6, se mantiene en fase de aplanospora. Sin embargo, al día 9, se observa un importante incremento de células en transición, continuando con un notable aumento en la tasa de crecimiento y división celular, tal es el caso que para el día 12, todas las células observadas estaban en fase vegetativa; este efecto de adaptación es comparable a resultados obtenidos en el trabajo realizado por Villamarín (2023), quien utiliza una concentración de urea en 0.44 g/L , principal fuente de nitrógeno para el metabolismo de la microalga.

Tabla 11 Morfología de *H. pluvialis* en medio artesanal durante 12 días en matraces.

Cambios morfológicos de <i>H. pluvialis</i> en matraces			
Días de cultivo	1	3	6
Medio artesanal			
Días de cultivo	9		12
Medio artesanal			

Elaborado por: (Los autores,2023)


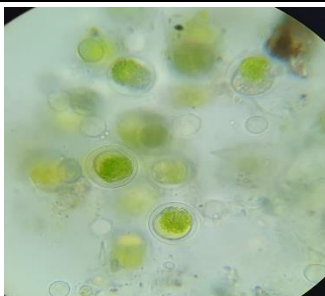
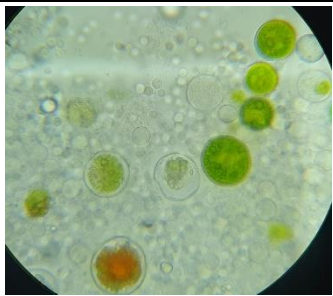
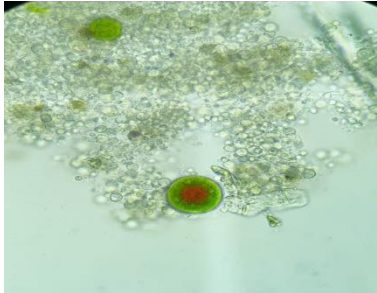
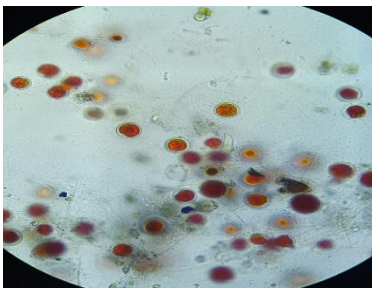




#### 4.3.4 Medio BG11

Al igual que en el medio RM, en el medio BG11 se tiene una curva de crecimiento que en el día 6 presenta su pico más alto con un valor de 245833 cel/mL, resultado que contrasta a las  $31,33 \times 10^4$  cel/mL obtenidos por Colusse et al. (2019) al cabo de 16 días, donde se destaca que factores como el pH y la cantidad de nitratos influye al valor de la densidad celular, esto se explica en que a mayor cantidad de nitratos habrá una menor cantidad de células en fase exponencial, dicho de otra manera, las células en los primeros días se encontraban en su fase palmela y conforme fueron transcurriendo los días estas en su gran mayoría pasaron a tornarse de un color rojizo, lo que representa su fase aplanospora (Ver tabla 12). Además, como en el caso del medio Rubic la falta de una fuente de luz provoca una disminución en la actividad celular tal y como lo citan Pereira & Otero (2020) los cuales demuestran en su estudio que valores menores a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica provocan su muerte celular debido a que sin ella se inhibe los procesos fotosintéticos.

Tabla 12 Fotografías del cambio morfológico de *H. pluvialis* en medio BG11 modificado durante 12 días en matraces.

Morfología de <i>H. pluvialis</i> en matraces			
Días de cultivo	1	3	6
Medio BG11 modificado			
Días de cultivo	9		12
Medio BG11 modificado			

Elaborado por: (Los autores,2023)

Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en medio modificado BG11

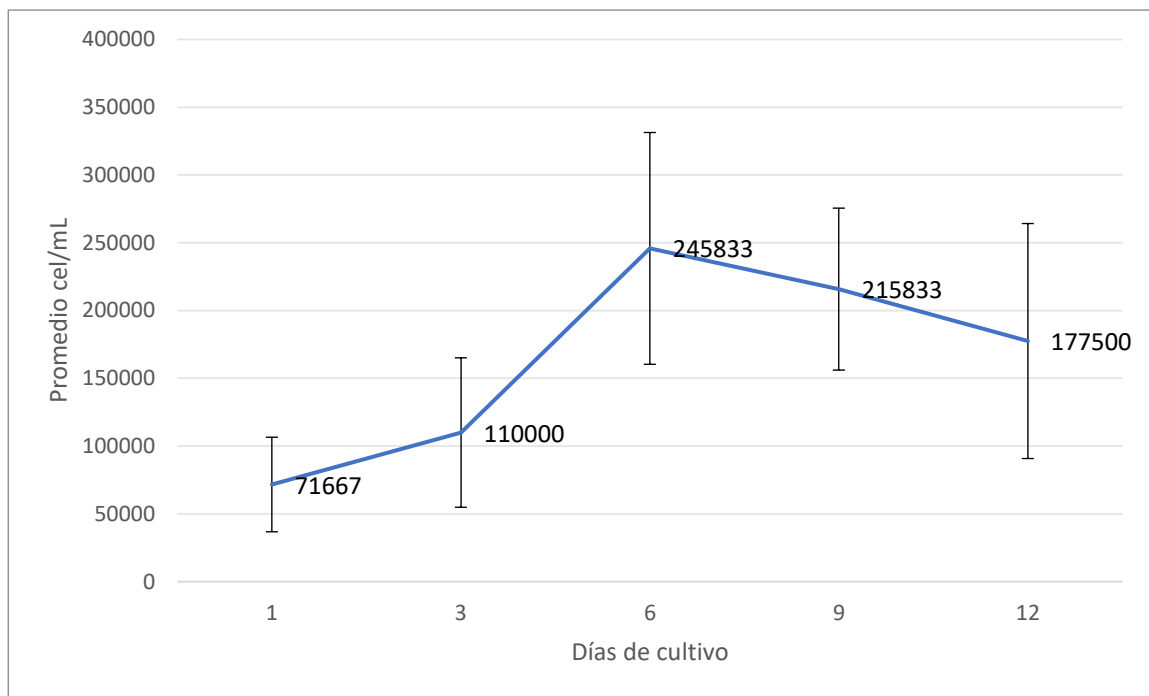


Figura 17 Cinética de crecimiento de *H. pluvialis* en el medio BG11 después de 12 días de siembra.

Elaborado por: (Los autores,2023)

#### 4.3.5 Análisis de varianza en tubos

ANOVA de un solo factor en tubos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,82671E+12	3	6,08904E+11	6,655296102	0,003979464	3,238871517
Dentro de los grupos	1,46387E+12	16	91491718750			
Total	3,29058E+12	19				

Figura 18 ANOVA para los cuatro medios en tubos

Elaborado por: (Los autores,2023)

Prueba de Tukey para tubos

	Media	D.E	
Artisanal	740000	399155,36	a
BM	690000	436455,90	a
RM	300500	127075,27	ab
Bg11M	0	0,00	b

Tabla 13 Análisis de Tukey para cuatro medios en tubos.

Elaborado por: (Los autores,2023)

$H_0$ = No existe diferencia significativa en el crecimiento de *H. pluvialis* en los tubos.

$H_1$ = Existe diferencia significativa del crecimiento de *H. pluvialis* en los tubos.

Los resultados obtenidos luego del análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) (Figura 18), arrojan un valor de probabilidad o número “p” de 0,003 menor al nivel de significancia de 0,05; lo que nos indica que existe diferencia significativa del crecimiento de *H. pluvialis* en los tubos con tratamiento de los cuatro medios de cultivo modificados, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa planteada.

Gracias a la prueba de Tukey (Tabla 13), podemos definir los medios de cultivo que han demostrado valores que difieren significativa y honestamente en su media. Dentro de los cuales vemos que el medio BG11 modificado es el que menos similitud presenta con los otros medios probados; además nos damos cuenta de que el medio artesanal, Bristol modificado y Rubic modificado, comparten características en cuanto al potencial uso para el crecimiento de *H. pluvialis*. Los resultados que se obtuvieron concuerdan con los presentados por Castillo et. al, 2017, donde comparan mediante el análisis ANOVA el crecimiento de *H. pluvialis* en los medios BM y RM, hallando que existe diferencia significativa con un valor p igual a 0,02, considerando un nivel de confianza del 95%.



#### 4.3.6 Análisis de varianza en matraces

ANOVA de un solo factor en matraces						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,7471E+11	3	2,58237E+11	4,184549079	0,046822046	4,066180551
Dentro de los grupos	4,93696E+11	8	61711979167			
Total	1,26841E+12	11				

Figura 19 ANOVA de los cuatro medios en matraces

Elaborado por: (Los autores,2023)

Prueba de Tukey para matraces			
	Media	D.E	
Artesanal	1382500	157935,90	a
BM	1041667	381455,55	ab
Bg11M	820833	213634,23	ab
RM	720000	175374,60	b

Tabla 14 Análisis de Tukey para los matraces

Elaborado por: (Los autores,2023)

$H_0$ = No existe diferencia significativa en el crecimiento de *H. pluvialis* en matraces.

$H_1$ = Existe diferencia significativa del crecimiento de *H. pluvialis* en los matraces.

Como se cita en la figura 19, luego del análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor aplicando un nivel de significancia de 0,05 se obtuvo un valor de probabilidad de 0,047, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Posterior a ello y por medio de la prueba de Tukey (Tabla 14), se comparó cuáles son los tratamientos que hacen que el crecimiento no sea igual, dando como resultado que los medios RM y artesanal son los que producen la diferencia. En el análisis de ANOVA elaborado por Leiton (2018) también se describe una diferencia entre tratamientos de medios BBM y RM, en donde se demostró que este último medio presenta un consumo mayor de

fosfatos y nitratos razón por la cual existe un mayor aumento en la densidad celular de *H. pluvialis*. Por otro lado, el medio artesanal por la adicción de urea como fuente de nitrógeno presenta una variación con respecto a los demás medios, lo mencionado se sustenta con lo publicado por Rizzo et al. (2022) quienes ensayaron el crecimiento y la forma más económica para producir *H. pluvialis* a través de la adicción de cuatro diferentes fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{NO})_3$  y urea), el resultado de su ANOVA con un valor de  $p=0,0017$  concluyó que la adición de urea produce un mayor rendimiento para *H. pluvialis*, además de ser la fuente más económica dentro del mercado.

## 5 Conclusiones y recomendaciones

- A partir del análisis precedente en los tubos del método ANOVA, concluimos que existe diferencia significativa entre el rendimiento de los medios BG11 modificado demuestra menor similitud con los medios Bristol, RM y artesanal en cuanto al potencial para el desarrollo de *H. pluvialis*.
- El medio artesanal propuesto, demostró ser útil para el desarrollo de *H. pluvialis*, pese a que su adaptabilidad se dio en un tiempo más prologado, se logró un importante crecimiento de  $1,38 \times 10^5$  cel/mL en matraces y  $7,4 \times 10^5$  cel/mL en tubos.
- Debido a lenta tasa de división celular y por consiguiente poca cantidad de biomasa obtenida luego de la purificación de esta microalga en relación con el tiempo de cultivo, se concluye que los factores físicos como pH, Intensidad y tiempo de exposición luminosa, así como fotoperiodo son condiciones determinantes para que *H. pluvialis* se desarrolle en un ambiente de laboratorio.
- Las gráficas de crecimiento de los medios nos llevan a concluir que *H. pluvialis* presenta una afinidad hacia la luz led blanca, ya que muestra una tendencia a permanecer en una fase exponencial cuando este factor está presente.
- Se considera a *H. pluvialis* como una microalga de exigencias nutricionales medianamente elevadas, ya que tuvo la capacidad para desarrollar con bajos signos de estrés, dentro de los medios modificados que tuvieron en su composición elementos como Nitrógeno, Sodio, Hierro y Fósforo básicamente.
- A partir de la incidencia de contaminación en los tubos y matraces, consideramos que para la obtención de cultivos puros de esta microalga se deben emplear métodos de conteo cuidadosos y con la menor manipulación fuera de la cámara de flujo.
- Se recomienda para futuros ensayos dentro de la universidad adquirir un agitador incubador orbital para uso propio con el fin de evitar alteraciones dentro del ensayo.

- Se sugiere el proseguir investigando el crecimiento de *H. pluvialis* con el medio BG11, cambiando su composición y ajustando el pH antes y después de auto clavar el medio, así como, se recomienda evaluar el crecimiento modificando condiciones de temperatura más baja y luminiscencia con luces LED de diferente color.

## 6 Bibliografía

- Arredondo-Vega, Bertha & Voltolina, Domenico. (2007). concentración, recuento celular y tasa de crecimiento
- Band, C. J. (2007). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal, 1–9.
- Bardales Grández, K., León Vargas, F., Grández Ruiz, M., & Jara Herrera, C. (2020). Influencia del nitrógeno en el crecimiento de *Ankistrodesmus sp.* (alga verde). *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 8(2), 141 - 150. <https://doi.org/10.22386/ca.v8i2.293>
- Bigurra-Quintero, Uldarico, Mendoza-Villarreal, Rosalinda, Robledo-Torres, Valentín, & Paredes-Jácome, José Rafael. (2020). Cinética de crecimiento in vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes medios de cultivo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(2), 00009. Epub 22 de diciembre de 2020. <https://doi.org/10.19136/era.a7n2.2310>
- Camacho, J. E., González, G., & Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *REDIPE*, 33. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Camacho, J. E., González, G., Lancheros, A., Díaz, L. (2019). Escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina, 11(19), 94–104. <https://docplayer.es/210151196-Serie-autores-iberoamericanos-macroproyecto-iberoamericano-de-educacion.html>
- Castillejo, P., Fernández, L. (2018). Aislamiento e identificación de la microalga *Scenedesmus sp* de la Laguna de Limoncocha para aplicación en la industria alimentaria [Tesis magister en gestión ambiental, Universidad Internacional SEK]. Repositorios digitales de la Universidad Internacional SEK <http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/3212>

- Cervantes, I (2018). Caracterización de cultivo de *Scenedesmus dimorphus* en raceways a nivel planta piloto como base para una refinería. Tesis. Ciudad de México, México: Instituto Politécnico Nacional.
- Choi Y, Sang Y, Jong P, 2011. Multistage operation of airlift photobioreactor for increased production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2011.
- Colusse, Guilherme & Duarte, Maria & De Carvalho, Júlio & Nosedá, Miguel. (2019). Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. Bioresource Technology Reports. 7. 100236. 10.1016/j.biteb.2019.100236.
- Córdoba Astroc, N., Acero Reyes, N., Duque Buitrago, L., Jiménez Aguilar, J., & Serna Jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21, 73-82. <https://doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>
- Cruz, I. (2019). Evaluación de microalgas endémicas para el cultivo y enriquecimiento de presas vivas y su aplicación en la primera alimentación de *Seriola rivoliana*. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Baja California Sur, México. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2960>
- Cuero Amú, K, Domínguez Castillo, J, Espitia Sánchez, K y Fuentes Cañón, L. (2019). Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Cultivo de microalgas. (n.d.). Fao.Org. Retrieved April 25, 2023, from <https://www.fao.org/3/ab473s/AB473S02.htm>
- Domínguez, A., Pereira, S., & Otero, A. (2019). Does *Haematococcus pluvialis* need to sleep? *Algal Research*, 44, 101722. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101722>
- Fernández, J. M. (2014). *Microalgas - definición y características*. Microalgal Biotechnology. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>

- Fontecha, F. (2014). Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales.
- García-Blásquez, Liz & Hernández Acevedo, Hanna & Aguirre, Marco. (2018). Manual de obtención de cepas de microalgas Instituto del mar del Perú octubre 2017 Callao, Perú <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3285>.
- Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C. ., Huérfano , J. ., Díaz , L. E. ., Rodríguez , J. ., & Camacho K. , J. E. . (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae, Volvocales*) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7–24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>
- González Medel, N. (2004). Aumento de la producción de biomasa en cultivos de *Haematococcus Pluvialis* mediante control de PH (Doctoral dissertation). <http://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/16277>
- Granda Jara, G. P. (2015). *Producción de Astaxantina a partir de la microalga Haematococcus Pluvialis* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito.
- Gómez y otros, Del mejoramiento genético al cultivo masivo a escala comercial de una cepa chilena de la microalga verde *Haematococcus pluvialis* con mayor productividad del cetocarotenoide rojo astaxantina, *AoB PLANTS*, Volumen 5, 2013, plt026, <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt026>
- Hernández Cortes, Á. (2019). Producción de biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando los medios de cultivo ohm y kobayashi en el biorreactor tecferm de 5 litros. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Hernández Morales, K. J., Pérez Morales, M. E., Jáuregui Romo, C., Alcántara Jurado, L. A., & Hurtado Ayala, L. A. (2015). *Condiciones de producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis: Revisión bibliográfica 2003-2013*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(1).

- Hoys Hernández, C. (2019). Análisis de metabolitos de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo durante la acumulación de astaxantina. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Imamoglu, Esra & Fazilet, vardar-sukan & Dalay, Meltem. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *Int J Nat Eng Sci.* 1. 5-9.
- Johnson Corrales, F. (2019). Evaluación de la Capacidad Antioxidante del Extracto de la Microalga *Haematococcus Pluvialis*, por el Ensayo OracFL en el Lector de Placas Varioskan Lux.
- Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121606>
- Hwang, Sung-Won & Choi, Hong Il & Sim, Sang. (2019). Acidic cultivation of *Haematococcus pluvialis* for improved astaxanthin production in the presence of a lethal fungus. *Bioresource Technology*. 278. 10.1016/j.biortech.2019.01.080.
- Lara, O. M. A. (2014). *Aspectos ecológicos, cultivo, contenido de lípidos totales y proteínas del fitoplancton nativo de un lago polimítico tropical (lago de Chapala)*. Tesis de maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Zapopan, México: Universidad de Guadalajara.
- Leal, M., Ortiz, N., Mora, R., Mora, R., Ruiz, G., & Perona, E. (2012). Caracterización de la Cianobacteria *Pseudanabaena galeata* a diferentes condiciones de cultivo. *Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas*, 35(3). Recuperado a partir de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/3965>
- Leiton Arcos, Y. A. (2018). Producción de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor Tecferm de 5L en medios de cultivo RM y BBM. [universidad colegio mayor de cundinamarca]. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3701/TRABAJO%20FIN%20AL%20H%20pluvialis%20c.pdf?sequence=2&isAllowed=y>



- Manrique Pinzón, M y Marín Corredor, D. (2019). Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor biostat ® a plus. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Martinez Rodriguez, P. A., Peinado Cardenas, M. J. ., y Camacho Kurmen, . J. E. (2021). Efecto de los parámetros cinéticos de escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactores para producir astaxantina. *Revista Mutis*, 12(2). <https://doi.org/10.21789/22561498.1739>
- Mercado de la astaxantina, Participación, tamaño y crecimiento de la industria. (2023). Mordor Intelligence. <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/astaxanthin-market>.
- Miranda, Alejandra M., Ossa, Edgar A., Vargas, Gabriel J., & Sáez, Alex A.. (2019). Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *Información tecnológica*, 30(1), 23-32. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000100023>
- Mora, R., Moronta, R., Ortega, J., & Morales, E. (1). Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.* aislada de la Represa de Tulé, municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*, 12(2). Recuperado a partir de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9214>
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, Page 459, 18(9), 459. <https://doi.org/10.3390/MD18090459>
- Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M., & Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, 255, 229–237. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.01.130>

- Niño-Castillo, Clara Milena, Rodríguez-Rivera, Francis Carolina, Díaz, Luis Eduardo, & Lancheros-Díaz, Ana Graciela. (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. Retrieved April 15, 2023, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702017000200019&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000200019&lng=en&tlng=es).
- Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. bin, Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 256, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/BIOM11020256>
- Pereira, S., y Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, 51, 102027. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102027>
- Pérez Zambrano, E y Ayala Agudelo, Y. (2019). Producción de Clorofila y Astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus Pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor Biostat Aplus de 5 litros. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Quintero Gómez, E. (2020). Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la producción del pigmento Astaxantina. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Ramírez Landínez, D. M. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

- Rizzo, A., Ross, ME, Norici, A. y Jesús, B. (2022). Un proceso de dos pasos para mejorar la producción de biomasa y la acumulación no destructiva de astaxantina y carotenoides en *Haematococcus pluvialis*. *Ciencias Aplicadas*, 12 (3), 1261.
- Rolón Oliveros, y Ibáñez Brand, C. (2021). Simulación a escala industrial de la producción de nutraceuticos obtenidos a partir de *Chlorella vulgaris*. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Sakarika, M., & Kornaros, M. (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource technology*, 219, 694-701.
- Salazar, M., Monroy, O., Tovar, M. D. L. A., Toriz, A., & Moreno, J. *Haematococcus pluvialis* aislada de la reserva de celestún, yucatán.
- Sánchez, A. (2019). Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia. Ottenido de: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5ddb915d24571NPvolumen20-46-58.pdf>
- Teng, Z., Zheng, L., Yang, Z., Li, L., Zhang, Q., Li, L., Chen, W., Wang, G., & Song, L. (2023). Biomass production and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* in large-scale outdoor culture based on year-round survey: Influencing factors and physiological response. *Algal Research*, 71, 103070. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103070>
- Tenorio, C., Hernández, H., Aguirre, M. y Aguilar, C. (2023). Actualización del Manual para obtención de cepas de microalgas. *Inf Inst Mar Perú*, 50(1), 68-82.
- Torres, L., Ubaque, J. (2021). Producción de Astaxantina usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz utilizando la biomasa de la microalga *Haematococcus Pluvialis* obtenida en el biorreactor Biostat a plus de 5 L [Tesis pregrado en bacteriología y laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. Repositorios digitales de la Universidad

Valera, S. J. (2016). *Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos.*

Villamarín Hidalgo, S. C. (2023). *Evaluación de medios de cultivo alternativos para la producción de biomasa de Haematococcus pluvialis* (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).

Wang, Feifei & Gao, Baoyan & Wu, Manman & Huang, Luodong & Zhang, Chengwu. (2019). A novel strategy for the hyper-production of astaxanthin from the newly isolated microalga *Haematococcus pluvialis* JNU35. *Algal Research*. 39. 101466. 10.1016/j.algal.2019.101466.

Yinga., G & Nió., A. (2019). Manual para producción de microalgas marinas en el Instituto del Mar del Perú. *Inf Inst Mar Perú*. (Vol. 46, pp 5-6).