

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Optimización del crecimiento y producción del carotenoide  
astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en  
diferentes condiciones de cultivo**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Beatriz Nava Gómez**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por

**Beatriz Nava Gómez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Director de tesis

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**

**Dra. Elena Solana Arellano**

**M. en C. Abelardo Campos Espinoza**



---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Beatriz Nava Gómez © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Beatriz Nava Gómez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga  
*Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
**Director de tesis**

El género *Haematococcus* es uno de los más importantes dentro de la biotecnología de microalgas debido a su capacidad para acumular pigmentos carotenoides, principalmente la astaxantina. En la literatura se menciona que algunas cepas de *Haematococcus* pueden alcanzar hasta un 5% de astaxantina libre con base en su peso seco. Por lo anterior, existe un creciente interés en el estudio de nuevas cepas aisladas localmente que tengan capacidad para producir este y otros compuestos de alto valor económico. Estudios previos indican que la acumulación de pigmentos en esta especie se presenta bajo condiciones de estrés, tales como limitación de nutrientes, altas intensidades de luz o diferentes salinidades. La microalga *Haematococcus* sp. empleada en este estudio fue aislada localmente, por lo que es importante conocer las condiciones adecuadas para su crecimiento y su potencial para la producción de carotenoides. Para evaluar las mejores condiciones de crecimiento se probó el medio selectivo Basal Bold 3N (MBB), tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y cuatro intensidades de luz (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en 100 mL de cultivo. El mayor número de células se obtuvo con 21°C y 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $320 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>). En el segundo ensayo de crecimiento se probó el fertilizante agrícola Plantafol (PL) y el medio MBB en un volumen útil de 300 mL con tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y una irradianza de 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En estos bioensayos se encontraron las biomásas más altas ( $207 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>) con el medio PL, temperatura de 21°C y una intensidad de luz entre 20 y 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Para la inducción a la carotenogénesis se realizaron tres bioensayos con diferentes condiciones de estrés, primero exponiendo los cultivos a ocho intensidades de luz (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en la segunda prueba se limitó la fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>) en el medio de cultivo (0, 50, 75 y 100%), con base en el MBB. En el tercer bioensayo se añadió NaCl al medio (0, 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M). En el segundo y tercer experimento se registró la absorbancia de astaxantina (476 nm) como indicador de acumulación del pigmento. Se obtuvo mayor grado de inducción con las intensidades de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en combinación de 0 y 100% de NaNO<sub>3</sub>, y con las salinidades de 0.034, 0.25 M y el control. Por lo que el experimento final de inducción consistió en probar el efecto interactivo de dos condiciones de nutrientes (0 y 100% de NaNO<sub>3</sub>), en combinación de dos salinidades (NaCl 0.034 y 0.25 M) más el control, con una irradianza de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Este experimento tuvo una duración de 15 días y durante su desarrollo se cuantificó el contenido de pigmentos por medio de espectrofotometría líquida de alta resolución (HPLC). Los mayores contenidos de astaxantina (27.5 mg g<sup>-1</sup>, 2.75%), luteína (28.3 mg g<sup>-1</sup>), cantaxantina (3.5 mg g<sup>-1</sup>) y  $\beta$ -caroteno (18 mg g<sup>-1</sup>) se obtuvieron en día 8, con el tratamiento con 0.034 M y 100% de NaNO<sub>3</sub>, mientras que el mayor contenido de clorofila *a* (173 mg g<sup>-1</sup>) se obtuvo en el día 2 con el mismo tratamiento.

**Palabras clave:** microalga, *Haematococcus*, condiciones de estrés, pigmentos y astaxantina.

Abstract of the thesis presented by **Beatriz Nava Gómez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Optimization growth and carotenoid astaxanthin production by the microalgae *Haematococcus* sp. in different culture conditions**

Abstract approved by:

---

Dr. Beatriz Cordero Esquivel  
Thesis Director

The genus *Haematococcus* is one of the most important in the biotechnology of microalgae due to its ability to accumulate carotenoid pigments, mainly astaxanthin. Some strains of *Haematococcus* can produce 5% free astaxanthin based on their dry weight. Therefore, there is a growing interest in studying new strains locally isolated to identify the capacity to produce this, and other compounds with high economic value. Previous studies indicate that the accumulation of pigments in this microalgae occurs under stress conditions, such as nutrients limitation, high light intensities or different salinities. The microalga *Haematococcus* sp. used in this study was locally isolated, and is important to know the best conditions for their growth and their potential production of carotenoids. The MBB 3N growth medium was tested, in combination with three temperatures (21, 23 y 25 °C) and four light intensities (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The greatest biomass was obtained at 21°C and 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $320 \times 10^3$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ). In the second growth assay, agricultural fertilizer Plantafol (PL) and MBB medium 3N with three temperatures (21, 23 and 25 °C) and 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  was tested. In these bioassays, biomass production ( $207 \times 10^3$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) with the PL, 21°C and a light intensity between 20 and 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  was the highest. For the carotenogenesis induction three bioassays were made with different stress conditions, first exposing the cultures to eight light intensities (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 and 1600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), in the second test the nitrogen source ( $\text{NaNO}_3$ ) was limited in the culture medium (0, 50, 75 and 100%) base in the MBB. In the third bioassay, NaCl was add to the medium (0, 0.034, 0.13, 0.25, and 0.43 M). In the second and third experiment, the absorbance of astaxanthin was registered (476 nm) as an indicator of pigments accumulation. The highest induction level obtained was with the intensities of 400 and 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , in combination of 0 and 100%  $\text{NaNO}_3$ , with the salinities of 0.034, 0.25 M and the control. The final induction experiment consisted in testing the interactive effect of two nutrients conditions (0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$ ), in combination with two salinities (NaCl 0.034 y 0.25 M) and the control, with an irradiance of 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . This experiment was extend for 15 days, and during its development the pigments content was quantify with a HPLC. The contents of astaxanthin ( $27.5 \text{ mg g}^{-1}$ , 2.75%), lutein ( $28.3 \text{ mg g}^{-1}$ ), cantaxanthin ( $3.5 \text{ mg g}^{-1}$ ) and  $\beta$ -carotene ( $18 \text{ mg g}^{-1}$ ) were the highest, obtained after eight days, with the treatments 0.034 M and 100% of  $\text{NaNO}_3$ , and with the same treatment the highest chlorophyll *a* content ( $173 \text{ mg g}^{-1}$ ) was achieved at day 2.

**Key words:** microalgae, *Haematococcus*, stress conditions, pigments, astaxanthin.

## Dedicatoria

---

*Al intermitente pero perseverante sentimiento de amor que me rodea,  
porque proviene solo de aquellos que me desean el éxito.  
Con este sentimiento que se me expresa y transmite de infinitas formas  
he logrado todo lo que me propongo,  
esto también es de ustedes.  
Los amo.*

## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de posgrado para realizar esta tesis.

Al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al departamento de Acuicultura por darme la oportunidad de realizar mi maestría en sus instalaciones.

A mi directora de Tesis la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, que de manera profesional me ayudó a encaminar y finalizar mi trabajo de maestría de la mejor manera posible, y me brindó una mano amiga en los momentos que lo necesité durante estos años.

A la Dra. Mónica Hernández y la Dra. Elena Solana A., por aceptar formar parte de mi comité de tesis, les agradezco sobre todo su tiempo, buenas observaciones, objetivos consejos, y la disposición que tuvieron para mejorar esta tesis en cada reunión.

Al M. en C., técnico y amigo Abelardo Campos, gracias por hacer más que simplemente tú trabajo, por aceptar formar parte de mi comité, por contribuir de muchas formas en mejorar la tesis y hacer más agradables y felices los días en CICESE.

Al grupo técnico de Acuicultura, Adrián Celaya Ortega, Luis Alberto Murillo, y Jesús Mariscal, que contribuyen de muchas formas indirectas en la realización de la tesis, y por ser personas con las que es fácil convivir y trabajar con una sonrisa.

A todos mis compañeros de maestría, por los buenos momentos que compartimos, porque aprendimos juntos, y porque al final todos nos llevamos algo de cada uno. A Sergio (eres el amigo invaluable que todos quisieran tener), Josué (por las pláticas, las risas y bonita amistad), Eduardo (siempre es agradable verte Lalo), Erik, Juan, César, Omar, Lily, Noemí, Laura, Gabriel y Jonathan, gracias a todos por igual.

A mis compañeros de laboratorio e intrusos incrustados en el cubito, que hicieron que cada día llegara feliz a trabajar, les agradezco su valiosa amistad, su opinión acerca de cada tema, cada chiste, consejo, plática, o la simple compañía. A Ana Lillían (compañera y amiga, te quiero Juanabele), a Enrique Zepeda (amigo microalga, películas y jueguitos, te quiero poquito menos, pero igual un montón <3), a Benito Niebla (.\_. Don cuca, señor cara de betta, también te quiero mucho), y a Marco A. Cruz (por ser siempre amable y servicial, gracias por ayudarme con las *Haematococcus* (ya me tocará a mí).

A mis papás Beatriz Gómez y Gabriel Nava, y mis hermanos Gabo y Rafa, por ser el pilar más fuerte sobre el que me sostengo, algún día les podré retribuir con creces todo lo que me han dado, los amo.

A Irving Azuara, mi mejor amigo desde hace tanto, eres mi gran amor y compañero en la vida, contigo sé que lo puedo todo, TE AMO. Sin ti, mi cantar sería diferente y definitivamente yo no sería tan feliz. Gracias por mantener mi alma sonriente, mi estómago contento, por nunca dejarme sola, por amarme incondicionalmente, por tratarme como una verdadera princesa y creer en mí ciegamente.

A mis tíos Enrique y Delia, mi primito Emilio, mis primos Debbie y Juan, mis preciosos sobrinos Juanito e Isabel, mi tía Lulú, mi prima Evelyn, a mi amigo Omar Martínez y mi suegra Ana D. Azuara. Gracias por su cariño, por estar siempre pendientes de mis avances y el progreso de mí trabajo, por interesarse en mis estados de ánimo y de salud. Sé que siempre cuento con ustedes <3

A mis hijos peludos, voltios y aretí... son la prueba más firme de amor desinteresado. Cada día cerca de ustedes me ayuda a curarme cualquier pena y toda preocupación se hace menos. ¡Me costaron media beca de CONACYT!

Y agradezco a todo aquel que haya omitido, pero que se alegra junto conmigo por este logro,

¡Muchas gracias!

## Tabla de contenido

---

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
Estudios en CICESE sobre el género <i>Haematococcus</i> .....	7
1.1. Justificación.....	8
1.2. Hipótesis.....	8
1.3. Objetivos.....	9
1.3.1. Objetivo General.....	9
1.3.2. Objetivos particulares.....	9
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos.....</b>	<b>10</b>
2.1. Obtención de la cepa de estudio.....	10
2.2. Aislamiento de <i>Haematococcus</i> sp. ....	10
2.3. Optimización del cultivo para producción de biomasa.....	10
2.3.1. Cultivo con diferentes temperaturas e intensidades de luz.....	10
2.3.2. Cultivo con diferentes medios enriquecidos.....	11
2.4. Inducción a la carotenogénesis.....	12
2.4.1. Inducción con altas intensidades de luz.....	12
2.4.2. Inducción con salinidad y luz.....	14
2.4.3. Experimentación con limitación de nutrientes y luz.....	14
2.4.4. Inducción por salinidad, nutrientes y luz.....	15
2.5. Extracción de pigmentos carotenoides.....	16
2.6. Análisis de pigmentos por HPLC.....	16
2.7. Cálculo del contenido de pigmentos en <i>Haematococcus</i> sp.....	17
2.8. Análisis y procesamiento de datos.....	18



<b>Capítulo 3. Resultados</b> .....	19
3.1. Evaluación de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo .....	19
3.1.1. Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes temperaturas e intensidades de luz.....	19
3.1.2. Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes medios de cultivo y temperaturas .....	23
3.2. Inducción a la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. por salinidad, nutrientes y luz .....	25
3.2.1. Evaluación de la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz.....	25
3.2.2. Evaluación de la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz y concentraciones de nutrientes .....	27
3.2.3. Evaluación de la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz y salinidades.....	31
3.2.4. Evaluación de la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. por salinidad, nutrientes y luz .....	35
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....	46
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b> .....	54
<b>Capítulo 6. Literatura citada</b> .....	55
<b>Anexo</b> .....	62

## Lista de figuras

---

Figura	Página
1 Ilustración del ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i> , arriba se observa la formación de una célula madre antes de liberar células flageladas. Abajo, célula flagelada (vegetativa); una vez que pierde los flagelos se forma una palmeloide, y continua la síntesis de carotenoides, hasta convertirse en una aplanospora (extraído y modificado de Shah <i>et al.</i> , 2016).....	6
2 Sistema utilizado para las pruebas de inducción a la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. Cuenta con ocho lámparas fluorescentes de luz blanca, cada lámpara tiene un punto focal para alcanzar las diferentes intensidades de luz: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600 (Zepeda-Lupio, 2017). .....	13
3 Crecimiento de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> ) cultivada a 21°C, con diferentes intensidades de luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	19
4 Crecimiento de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> ) cultivada a 23°C, diferentes intensidades de luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	20
5 Crecimiento de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> ) cultivada a 25°C, diferentes intensidades de luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar (n=3). .....	21
6 Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> ) cultivada en el Medio Basal Bold 3N (MBB), en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C), a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	23
7 Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. (cél·mL <sup>-1</sup> ) cultivada con fertilizante agrícola Plantafol (PL) en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C), a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican el error estándar (n=3). .....	24
8 Placas de cultivo con <i>Haematococcus</i> sp. que fueron expuestas a ocho intensidades de luz. El orden en que aparecen las placas, de izquierda a derecha, son de la menor a la mayor intensidad de luz. a) placas de cultivo al día 0, b) placas de cultivo al día tres, c) células en el día 0 (objetivo 10x); d) célula con pared rota (liberando los pigmentos al medio), en el día 3 y con una intensidad de luz de 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; e) células de <i>Haematococcus</i> sp. en su fase vegetativa, y f) células de <i>Haematococcus</i> sin material celular dentro ( $\blacktriangleright$ ) y aplanosporas (color rojo), obtenidas en los tratamientos de 800, 1000, 1300 y 1600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	26

9	Placas de cultivo de <i>Haematococcus</i> sp. para evaluar la inducción a la carotenogénesis en cuatro intensidades de luz: 100, 200, 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en combinación con cuatro condiciones de nutrientes: 0% (1), 50% (2), 75% (3) y 100% (4). Días de cultivo: 0 (a), 1 (b), 3 (c) y 4 (d). Experimento con 16 tratamientos (n= 4).	28
10	Valores de absorbancia (ua), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp. con limitación de $\text{NaNO}_3$ en diferentes porcentajes (75 y 50 %) de $\text{NaNO}_3$ en el medio MBB 3N, y dos intensidades de luz (400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4).....	29
11	Valores de absorbancia (ua), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp. con limitación de $\text{NaNO}_3$ (100 y 0 % de $\text{NaNO}_3$ en el medio MBB 3N), y dos intensidades de luz (400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4).....	30
12	Placas de cultivo para evaluar la inducción a la carotenogénesis en <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes intensidades de luz: 100, 200, 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en combinación con cuatro salinidades, NaCl: 0.034 (1), 0.13 (2), 0.25 (3) y 0.43 (4) Molar, y control (C). Días 0 (a), 1 (b), 3 (c) y 4 (d). (n= 4).....	32
13	Valores de absorbancia obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp. con dos salinidades (0.034 y 0.13 M de NaCl), y dos intensidades de luz (400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) más un control (0 M de NaCl y 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4).....	34
14	Valores de absorbancia obtenidos con una longitud de onda de 476 nm en muestras de inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp. con limitación de $\text{NaNO}_3$ (100 y 0 % de $\text{NaNO}_3$ en MBB 3N), y dos intensidades de luz (400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4). .....	35
15	Peso seco orgánico (PSO, en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0% y 100% de $\text{NaNO}_3$ en el MBB. Las barras verticales indican el error estándar (n= 3).....	36
16	Contenido de astaxantina ( $\text{ng mg}^{-1}$ , con base en el peso seco total), de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0% y 100% de $\text{NaNO}_3$ en el medio Basal Bold. A): Resultados obtenidos en los días 2, 4, 6, 8 y 14; B) Resultados obtenidos en el día 0. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p<0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	37
17	Contenido de luteína ( $\text{ng mg}^{-1}$ , con base en el peso seco) de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de $\text{NaNO}_3$ en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p<0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar (n=3).....	40

- 18 Contenido de cantaxantina ( $\text{ng mg}^{-1}$  con base en el peso seco) en *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14 de cultivo. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ )..... 41
- 19 Contenido de clorofila *a* ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  con base en el peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14 de cultivo. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ )..... 42
- 20 Contenido de  $\beta$ -caroteno ( $\text{ng mg}^{-1}$  con base en el peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ). 43
- 21 Cultivos de *Haematococcus* sp. en condiciones de estrés salino y limitación de nutrientes en el día 14 de evaluación. Los tratamientos se muestran de izquierda a derecha comenzando por 0 M NaCl, 0%  $\text{NaNO}_3$  (A); 0 M, 100% (B); 0.034 M, 0% (C); 0.034 M, 100% (D); 0.25 M, 0% (E) y 0.25 M, 100% (F). ..... 44

## Lista de tablas

---

Tabla	Página
1 Concentración de los componentes mayores del Medio Basal Bold 3N (UTEX, The Culture Collections of Algae).....	11
2 Gradiente de dilución de la fase móvil empleado en el análisis de pigmentos en HPLC.	17
3 Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ , divisiones·día <sup>-1</sup> ) de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y cuatro intensidades de luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en Medio Basal Bold 3 N.....	22
4 Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ , divisiones·día <sup>-1</sup> ) de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y dos medios de cultivo (Medio Basal Bold 3N y fertilizante agrícola Plantafol), con una intensidad de luz de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	25
5 Valores de absorbancia (ua, promedio $\pm$ error estándar), a una longitud de onda de 476 nm, obtenidos de la evaluación de cuatro intensidades de luz (100, 200, 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en combinación con cuatro condiciones de nutrientes, con base en el MBB 3N (0, 50, 75 y 100 % de NaNO <sub>3</sub> ) en la inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp., para los días del 0 al 4. Las letras indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día de cultivo ( $p < 0.05$ ) (n= 4).....	29
6 Valores de absorbancia (ua $\pm$ error estándar), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, de la evaluación de cuatro intensidades de luz (100, 200, 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en combinación de cuatro salinidades (NaCl: 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M) en la inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp., para los días del 0, 1, 2 y 5. Las letras indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ) (n= 4).....	33
7 Rendimiento de astaxantina (mg L <sup>-1</sup> ) en cultivos de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0% y 100% de NaNO <sub>3</sub> , en los diferentes días de cultivo ( $\pm$ Error estándar) (n=3).....	38
8 Contenido de astaxantina (%), en <i>Haematococcus</i> sp. en condiciones de estrés, durante los días de cultivo, en diferentes tratamientos: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, con 0 y 100% de NaNO <sub>3</sub> en el medio Basal Bold (n=3).....	39
9 Contenido promedio de pigmentos en mg g <sup>-1</sup> ( $\pm$ Error estándar) obtenidos en cultivo de <i>Haematococcus</i> sp. bajo diferentes condiciones de cultivo: estrés salino (0, 0.034 y 0.25 M de NaCl), y por limitación de NaNO <sub>3</sub> con base en el MBB (n=3).....	45

## Capítulo 1. Introducción

---

Las microalgas son organismos microscópicos de conformación unicelular con capacidad para realizar fotosíntesis, pueden aprovechar la energía solar y transformarla en energía química de forma más eficiente que muchas plantas superiores (Priyadarshani y Rath, 2012). Estos organismos pueden encontrarse tanto en medio marino como dulceacuícola, formando la base de la cadena alimenticia, ya que son requeridas en diferentes etapas tempranas de moluscos, crustáceos, peces y durante todo el ciclo de desarrollo de los moluscos bivalvos (Richmond, 2004).

El principal interés en las microalgas crece con base en su potencial para producir biomasa útil como fuente de alimento, y para la obtención de compuestos biológicos de gran valor económico (Richmond, 2004), debido a sus contenidos de ácidos grasos (Handayaniam *et al.*, 2012), proteína de alta calidad (Becker, 2007; Gimpel *et al.*, 2014), vitaminas (El Baz *et al.*, 2002), pigmentos y esteroides (Muller-Feuga, 2000), por mencionar algunos. Todos estos compuestos son extraídos para su uso como fuente de alimento, en farmacéuticos, en fertilizantes, e incluso recientemente como fuentes energéticas alternas a combustibles fósiles, como es el caso de los biocombustibles (Patil *et al.*, 2005; Albarracín, 2007; Barajas *et al.*, 2009).

Existe un gran número de especies cuya producción tiene un uso o aplicación directa en la industria acuícola y/o biotecnológica. Dentro de las especies más producidas y estudiadas destacan *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) debido a su alto contenido proteico (Colla *et al.*, 2007), *Dunaliella salina* para la producción de pigmentos, y diferentes especies de *Chaetoceros* spp. e *Isochrysis* sp., principalmente para su uso como alimento en la industria acuícola (Priyadarshani y Rath, 2012).

En la selección de una especie de microalga para cultivar, se deben considerar los aspectos fisiológicos más relevantes, como el crecimiento, la reproducción y el desarrollo, ya que las microalgas responden conforme a las condiciones del ambiente en el que se encuentran, siendo la luz, la temperatura y los nutrientes los factores de mayor importancia que van a influir en su composición bioquímica (Borowitzka, 1998; Hu, 2004).

Un ejemplo de la importancia de estos parámetros, es la cantidad y calidad de la luz a la que se encuentran expuestas las microalgas en sistemas de cultivo abierto, y la rapidez y/o frecuencia de los cambios que se generen en esta, pueden dar lugar a una fotoaclimatación en la célula, lo que podría acelerar o disminuir su tasa de crecimiento (Torzillo y Vonshak, 2013) y modificar su composición bioquímica (Hu, 2004).

Además, el tipo de luz a la que se expone un cultivo afecta el metabolismo del carbono, la variación de los pigmentos, la actividad enzimática, y puede favorecer la síntesis de ADN y ARN (Zachleder *et al.*, 2016). Velasco *et al.* (2009), describen el efecto de la fotoinhibición observado en la microalga *T-ISO galbana*, ya que la tasa de producción de fotosíntesis tuvo un incremento proporcional al incremento en la intensidad de luz, sin embargo, con altas intensidades de luz, la tasa fotosintética disminuye, afectando así la tasa de replicación de la célula, y por lo tanto su biomasa. Un gran número de estudios reporta que es necesario que en los cultivos de microalgas exista un régimen de luz/obscuridad para la fase oscura y luminosa, en donde se producen moléculas de ATP (Adenosin trifosfato) y NADPH, que son necesarias para el crecimiento celular (Al-Qasmi *et al.*, 2012). Además, estos estudios sugieren que ciertas longitudes de onda, con luces cercanas al azul o al rojo, mejoran el crecimiento para la mayoría de las especies de microalgas que contienen clorofilas *a* y *b*, como es el caso de las Clorofitas, debido a que existe menor cantidad de energía entre estas longitudes de onda y son más aprovechables para las células (Singh y Singh, 2015).

Además de la luz, la temperatura es otro factor limitante en el cultivo de microalgas, y es esencial conocer la tolerancia y adaptabilidad de la especie, debido a que generalmente la temperatura óptima para el crecimiento es muy cercana a la temperatura letal (Borowitzka, 1998; Ras *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, el efecto independiente o combinado de la temperatura y la intensidad de luz, induce cambios en la fisiología de la microalga. Por ejemplo, la tasa de crecimiento, la producción de enzimas para la fosforilación, y el transporte de electrones para llevar a cabo la fotosíntesis, son variables que dependen de la temperatura, y pueden diferir en su respuesta con respecto a la cantidad de luz disponible, afectando también la tasa fotosintética (Davison, 1991; Borowitzka, 1998). Se sabe que temperaturas menores a la temperatura óptima se relacionan con tasas de crecimiento altas. Esta respuesta puede ser explicada por medio de la cinética de crecimiento con respecto al incremento de la temperatura. Como resultado de la ecuación se obtiene el coeficiente  $Q_{10}$ , este valor nos indica el incremento en la tasa de crecimiento por cada incremento de 10 °C en la temperatura, cuando el  $Q_{10}$  es igual a 2, nos indica que la tasa de crecimiento aumenta al doble. Sin embargo, el rango de tolerancia de temperatura entre especies, incluso del mismo género varía, siendo un valor especie específico (Ras *et al.*, 2013).

Por lo anterior es recomendable considerar el ambiente en el que serán cultivadas las microalgas, ya que los sistemas abiertos no permiten controlar este parámetro, generando condiciones extremas entre el día y la noche, afectando la producción de biomasa celular (Borowitzka, 1998; Ras *et al.*, 2013).

Otro de los aspectos importantes para las microalgas son los nutrientes que aseguren el crecimiento de las células, ya que deben ser proporcionados en el medio de acuerdo a los requerimientos de cada especie

en particular, principalmente carbono, nitrógeno, fósforo (silicatos en el caso de las diatomeas) como componentes mayores, y como microcomponentes se encuentran ciertas vitaminas y metales traza como hierro, cobalto y magnesio (Becker, 1994; Hu, 2004). La falta de algún macronutriente en el medio de cultivo puede generar cambios en la composición de la célula, disminuyendo la síntesis de ARN y ADN (menor contenido de proteínas), mientras aumenta la producción de lípidos o carbohidratos. En el caso de las diatomeas, la falta de sílice (Si) en el medio afecta el perfil de los ácidos grasos, como es el caso del género *Chaetoceros* disminuyendo el contenido del ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3) y docosahexaenoico (C22:6 $\omega$ 3), que son importantes en la nutrición de organismos acuícolas en etapas larvarias (Harrison *et al.*, 1990; Richmond, 2004).

Otro de los nutrientes que pueden ser limitantes para el desarrollo de las microalgas es el magnesio, ya que este micronutriente es necesario para formar los centros de reacción de las moléculas de clorofila *a*, por lo que una disminución de las concentraciones de magnesio en el medio de cultivo repercutiría en la tasa fotosintética, y como consecuencia en la replicación de la célula (Harrison *et al.*, 1990; Gorain *et al.*, 2013). Sin embargo, altas concentraciones de nutrientes en el medio no siempre favorecen la producción de biomasa celular, ya que las microalgas (en su gran mayoría), absorben nutrientes del medio con un comportamiento que puede ser explicado por medio de la ecuación de Michaelis-Menten, a esta respuesta para adquirir nutrientes del medio se le conoce como cuota celular (Q), donde generalmente en un ambiente saturado de nutrientes hay una relación entre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el requerimiento de dicho nutriente, entonces a mayor concentración, menor incorporación, que resulta en una menor tasa de crecimiento específica (Harrison *et al.*, 1990).

La acumulación de compuestos biológicos de interés a partir de la biomasa de microalgas es ocasionada precisamente por cambios en las condiciones de cultivo en el que se están desarrollando. Cuando la célula es expuesta a condiciones de estrés tales como la limitación de nutrientes, condiciones extremas como altas temperaturas, altas salinidades y/o altas intensidades de luz, es posible que se acumulen compuestos biológicos, principalmente ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos carotenoides (Torzillo y Vonshak, 2013; Hu, 2004).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles, que son ampliamente estudiados debido a las múltiples funciones celulares en las que participan, como la conformación de lipoproteínas y en la protección contra los rayos UV, entre otras. Los carotenoides se desarrollan en diferentes organismos, como hongos, plantas superiores, halobacterias, y en microalgas. Particularmente en microalgas desempeñan un papel clave en la fotosíntesis, tanto estructural como funcional y son fotoprotectores ante altas intensidades de luz, ya



que ayudan a absorber luz en longitudes de onda entre los 400 y 600 nm (Guerrero *et al.*, 1999). Estos pigmentos constituyen uno de los grupos más importantes en la vida marina (Shahidi y Brown, 1998), ya que son los que brindan la coloración característica a una gran variedad de especies de peces, moluscos y crustáceos marinos, así como de algunos organismos de agua dulce dando tonalidades que van desde el amarillo claro hasta el rojo profundo. Sin embargo, los organismos no son capaces de sintetizar estos pigmentos, debido a que no poseen las enzimas necesarias, por lo que deben ser suministrados en su dieta (Steven, 1948). Estos pigmentos también son importantes para seres humanos, ya que forman parte de la defensa antioxidante interfiriendo con compuestos carcinogénicos y reaccionando con radicales libres al ceder electrones y neutralizar su potencial oxidativo (Johnson, 1991; Guerin *et al.*, 2003; Perera y Mei Yen, 2007 NEEB). Por estas razones se consideran benéficos y útiles en la prevención de múltiples enfermedades, como cáncer (ciertos tipos de cáncer de piel, de mama, y del sistema gastrointestinal), enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular, cataratas y enfermedades de degenerativas o del sistema inmune. Lo que estimuló el interés de llevar a cabo estudios epidemiológicos, cuyos resultados sugieren fuertemente que el consumo de alimentos ricos en carotenoides reduce la incidencia de dichas enfermedades (Perera y Mei Yen, 2007 NEEB).

Los carotenoides de mayor importancia son el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina, cuya demanda ha ido en incremento desde hace algunas décadas (Cañizares-Villanueva y Perales-Vela, 2011). El  $\beta$ -caroteno se encuentra disponible de forma sintética desde 1956 y es el primer pigmento carotenoide que comenzó a producirse de forma natural a partir de la microalga *Dunaliella salina* (Bernhard, 1989). Entre las propiedades que posee el  $\beta$ -caroteno se han reportado: ser precursor de la vitamina A (en mamíferos a través de la enzima " $\beta$ -caroteno-15, 15'-dioxigenasa", presente en el sistema digestivo), y protector de los daños por foto-oxidación al actuar contra radicales libres neutralizando las moléculas de  $O_2$  (por medio de la absorción y asimilación de los pigmentos en el torrente sanguíneo) (Krinsky, 1989; Shahidi y Brown, 1998; Perera y Mei Yen, 2007; Cañizares-Villanueva y Perales-Vela, 2011). Actualmente existen dos empresas de producción masiva de *Dunaliella salina* para la extracción de  $\beta$ -caroteno, establecidas en Estados Unidos y Australia (Guerrero *et al.*, 1999). En cultivos extensivos, la combinación de altas salinidades y limitación de nutrientes, permiten la acumulación de  $\beta$ -caroteno hasta en un 14% del peso seco de la biomasa de *Dunaliella salina* (Borowitzka *et al.*, 1984; Borowitzka *et al.*, 1988; Ben-Amotz *et al.*, 2009).

Por otro lado, el mercado principal de la astaxantina se establece en la industria acuícola, para incrementar la pigmentación en la carne del salmón y también se utiliza la "*salmonización*" en algunas especies de peces como trucha y tilapia, así como para elaborar alimento para peces de ornato (Guerrero *et al.*, 1999;

Lorenz y Cysewski, 2000; Pan *et al.*, 2001). La astaxantina ha sido comercializada de forma sintética desde 1984 (Bernhard, 1989). Sin embargo, se han encontrado fuentes naturales alternativas, que se pretende sean más adecuadas para su inclusión en productos para la salud humana y animal, debido a su origen natural, y a que existen reportes recientes de mayores tasas de depositación del pigmento natural en los organismos en cultivos acuícolas (Torrissen *et al.*, 1989; Johnson y An, 1991). Además, la astaxantina al igual que el  $\beta$ -caroteno, tiene aplicación en cosmética, farmacéutica, y ha sido utilizada como complemento para alimento de pollos, dando mejor coloración a los huevos y a la carne (Lorenz y Cysewski, 2000; Guerin *et al.*, 2003).

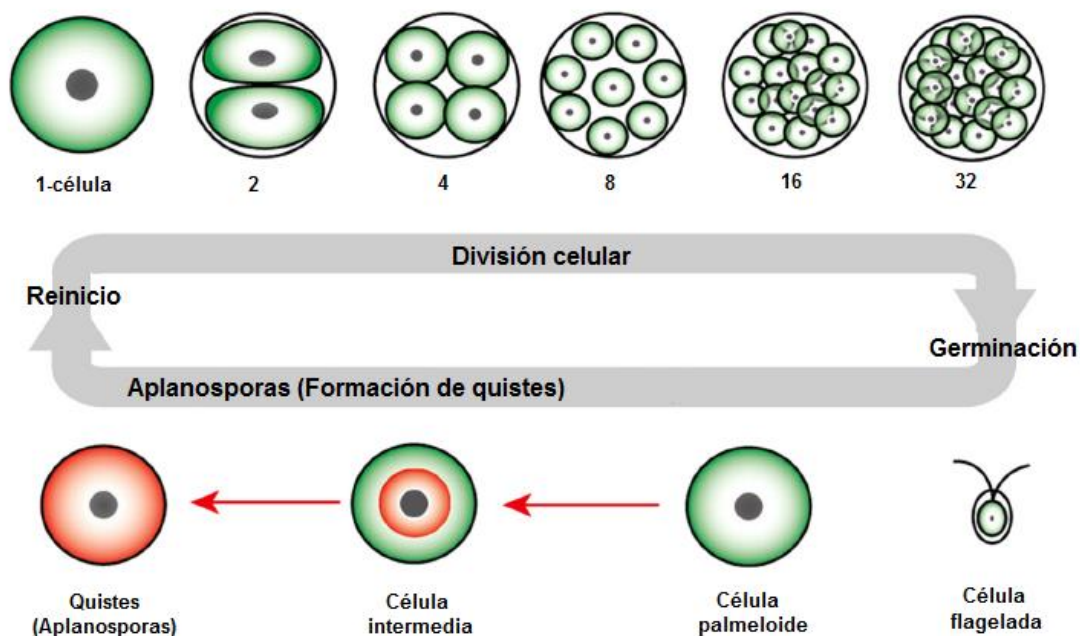
Algunas de las funciones biológicas y propiedades de la astaxantina que se han reportado para la salud humana son: el papel que desempeñan como protección contra la foto-oxidación (principalmente luz UVB) que sobrepasa la capacidad antioxidante que poseen el  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, la vitamina C y E (Lorenz y Cysewski, 2000; Guerin *et al.*, 2003), reduce el riesgo de adquirir la ceguera ocasionada por la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (Guerin *et al.*, 2003), previene el padecimiento de enfermedades cardiovasculares como arterioesclerosis (Frei, 1995; Lorenz y Cysewski, 2000), por mencionar algunas. Además, estudios recientes realizados en ratones demuestran mejoramiento en algunos tipos de cáncer (Nagaraj y Rengasamy, 2012). Mientras que las funciones reportadas para organismos superiores son: antioxidante, precursor de hormonas, fortalece el sistema inmune, mejora el crecimiento (particularmente en organismos acuícolas) y el comportamiento reproductivo (Lorenz y Cysewski, 2000).

Por todo lo mencionado anteriormente, y con el interés del desarrollo biotecnológico de por medio, se ha profundizado en el estudio de algunas especies de microalgas que destacan por su uso como fuentes de compuestos para suplementos nutricionales en salud animal y humana. Así como en la obtención de pigmentos naturales para su inclusión en alimentos destinados a organismos en cultivo, entre las que sobresalen el género *Chlorella* spp., las especies *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina* (Shahidi y Brown, 1998; Guedes y Malcata, 2012). Existe un especial interés biotecnológico en el género *Haematococcus* sp., una microalga dulceacuícola que pertenece a la clase Chlorophyceae. Se puede encontrar comúnmente en cuerpos de agua temporales, debido a que es común que en estos microambientes no compite con otras microalgas, además es posible encontrarla adherida a rocas y sedimentos de pozas (Droop, 1961; Lorenz, 1999).

La levadura *Phaffia rhodozyma* (Johnson y An, 1991; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010), la halobacteria *Halobacterium salinarum* (Cañizares-Villanueva y Perales-Vela, 2011), la microalga *Haematococcus* spp. y

los caparzones de crustáceos (Yashai, 2009), son algunas de las fuentes naturales de astaxantina. Sin embargo, el mayor porcentaje de acumulación del pigmento se obtiene con la especie *Haematococcus* spp., con valores de hasta 5% de astaxantina con base en su peso seco (Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi *et al.*, 1991; Boussiba, 2000; Lorenz y Cysewski, 2000) de ahí el gran interés de su producción.

*Haematococcus* sp. posee un ciclo de vida complejo, comenzando con su fase vegetativa o biflagelada, ya que cuenta con dos flagelos que facilitan su desplazamiento. Cuando las condiciones del medio no son favorables, el estrés provoca la pérdida de los flagelos y comienza el proceso de acumulación de pigmentos carotenoides (principalmente astaxantina), a esta fase se le denomina palmeloide. Si las condiciones de estrés permanecen, la pared celular comienza a endurecer hasta que finalmente se convierte en quiste, fase a la que también se le conoce como aplanospora (Elliott, 1934). En esta fase la célula adquiere una coloración roja característica del pigmento carotenoide astaxantina y una pared celular altamente resistente. Cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables para su crecimiento, es posible que la microalga comience con la fase de germinación, en la que se revierte el proceso de enquistamiento y la célula desarrolla los flagelos al igual que la coloración verde, por la acumulación de clorofila (Kobayashi *et al.*, 1997) (Figura 1).



**Figura 1.-** Ilustración del ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*, arriba se observa la formación de una célula madre antes de liberar células flageladas. Abajo, célula flagelada (vegetativa); una vez que pierde los flagelos se forma una palmeloide, y continúa la síntesis de carotenoides, hasta convertirse en una aplanospora (extraído y modificado de Shah *et al.*, 2016).

Para la producción de astaxantina en esta microalga se requiere de dos pasos principales, el primero consiste en la producción de biomasa en estado vegetativo, posteriormente el segundo paso consiste en exponer a la biomasa celular a las condiciones de estrés descritas anteriormente, para provocar el enquistamiento y como consecuencia la producción y acumulación del pigmento (Lorenz y Cysewski, 2000; Nagaraj y Rengasamy, 2012), proceso al que se le conoce como carotenogénesis (Boussiba, 2000).

La carotenogénesis en *Haematococcus* sp. se ha desarrollado a partir de diferentes condiciones que generan el estrés, induciendo así la biosíntesis de astaxantina. Entre los diversos procedimientos para desarrollarla se reporta principalmente la limitación de nutrientes, particularmente de nitrógeno y fósforo, exposición a altas intensidades de luz y/o altas temperaturas (Fábregas *et al.*, 1998; Boussiba, 2000; Richmond y Hu, 2004; Hong *et al.*, 2015).

Con base en otros trabajos de investigación relacionados a la producción de *Haematococcus* sp., el presente estudio tiene como objetivo evaluar diferentes condiciones de cultivo para la producción de biomasa de *Haematococcus* sp., las condiciones óptimas para su cultivo. Además, se pretende evaluar diferentes condiciones de estrés que favorezcan la producción de pigmentos carotenoides, principalmente el pigmento astaxantina.

### **Estudios en CICESE sobre el género *Haematococcus***

En el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) se han realizado algunos estudios con otras cepas de *Haematococcus*, en los que se pudo inducir a la carotenogénesis a partir de diversas condiciones de cultivo, tanto para generación de biomasa, como para la inducción a la producción de carotenoides. Calero-Estévez (1998) cultivó *H. lacustris* y *H. pluvialis*, obteniendo mejores densidades celulares con  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , una vez obtenida la biomasa, se expuso a una intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$  y se limitó de nitrógeno y fósforo, obteniendo entre 0.13 y 1.80% de astaxantina en ambas especies. Por otro lado, Escuredo-Vielba (2014), evaluó en *Haematococcus* sp. diferentes medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas y obtuvo las mayores densidades con un fertilizante llamado Plantafol y una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , para la producción de pigmentos se probó el efecto interactivo entre la limitación total de nutrientes y una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , favoreciendo la producción de astaxantina en esta cepa.

A pesar de los diversos estudios realizados por varios autores para obtener la producción más eficiente de astaxantina en el cultivo de *Haematococcus* sp., es necesario continuar las investigaciones con nuevas

especies, por lo cual este trabajo pretende utilizar técnicas ampliamente descritas para la producción de pigmentos carotenoides, en una especie de *Haematococcus* aislada localmente y evaluar su capacidad para producir el pigmento astaxantina.

### **1.1. Justificación**

El estudio de las microalgas es un área de investigación en constante crecimiento debido al alto potencial que poseen como fuentes de compuestos biológicos de alto valor, como los ácidos grasos poliinsaturados, proteínas de alta calidad, ésteres, vitaminas y pigmentos, entre otros, sin embargo, a pesar del conocimiento que a la fecha existe sobre diferentes aspectos relacionados con el cultivo de microalgas, aún se requiere continuar con el desarrollo de tecnologías que optimicen la producción de especies con potencial económico. Además, es relevante conocer y estudiar nuevas especies de microalgas, principalmente aquellas aisladas localmente que presenten características de interés en la industria acuícola, o bien para obtener compuestos de alto valor económico.

La búsqueda de nuevas fuentes naturales de pigmentos carotenoides, alternas a las producidas sintéticamente, es sumamente importante debido a la creciente demanda de pigmentos destinados tanto para consumo humano como para la acuicultura por los múltiples efectos benéficos que se les atribuyen.

Lo anterior, define la necesidad del estudio de nuevas especies de microalgas para la obtención de pigmentos carotenoides de origen biológico. Por tal motivo, este trabajo pretende evaluar el crecimiento de una nueva especie de *Haematococcus*, para la obtención de biomasa y posteriormente valorar su capacidad para producir carotenoides. Por lo cual, se probarán diferentes intensidades de luz y temperaturas para la producción de biomasa, así como el efecto interactivo de la limitación de nutrientes y altas intensidades de luz para la producción de astaxantina.

### **1.2. Hipótesis**

El crecimiento de *Haematococcus* sp. será mayor a temperaturas (21 y 23 °C) e intensidades de luz bajas (entre 20 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

El efecto interactivo de la limitación de nutrientes, salinidad y altas intensidades de luz incrementará la producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar la producción de biomasa por *Haematococcus* sp. bajo diferentes temperaturas e intensidades de luz e inducción a la carotenogénesis en condiciones de estrés (limitación de nutrientes y altas intensidades de luz).

#### **1.3.2. Objetivos particulares**

- Evaluar la biomasa (número de células) de *Haematococcus* sp. cultivada en diferentes temperaturas (21, 23 y 25 °C) e intensidades de luz (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).
- Evaluar la biomasa producida (número de células y peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes temperaturas (21, 23 y 25 °C) con dos medios de cultivo (MBB y Plantafol) a una intensidad de luz de 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .
- Determinar el perfil y la concentración de pigmentos (carotenoides y clorofilas) producidos por *Haematococcus* sp. en condiciones de cultivo óptimas y de estrés.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

---

### 2.1. Obtención de la cepa de estudio

La microalga *Haematococcus* sp. fue colectada en la localidad “El Salto”, perteneciente al municipio de Ensenada, en el Estado de Baja California, en las coordenadas 32° 02' 26.50" N y 116° 45' 47.28" O. La colecta se realizó durante el mes de febrero del año 2015, a partir de distintos estancamientos de agua provenientes de una cascada y rocas de los alrededores.

Una vez en el laboratorio de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE, a las muestras de agua colectadas que contenían la cepa en su forma palmeloide y aplanospora, se les agregó Medio Basal Bold 3N (MBB), con la finalidad de conseguir su reproducción y su posterior aislamiento.

### 2.2. Aislamiento de *Haematococcus* sp.

Para el aislamiento de *Haematococcus* sp. se utilizaron diferentes métodos, comenzando por diluciones seriadas, partiendo de una fracción de las muestras líquidas originales e inoculándolas en tubos de 15 mL (con un volumen útil de 10 mL) y agregando el medio selectivo MBB (3N). Además, se utilizó el método de aislamiento por micropipetas para extraer células de manera individual, y posteriormente realizar su sembrado en tubos de 15 mL (como se mencionó anteriormente), así como en placas con agar para cultivo de algas (HIMEDIA®).

Otro método consistió en realizar raspados de los quistes (aplanosporas) adheridos a rocas, utilizando un asa bacteriológica y colocando la muestra en un recipiente con agua destilada estéril, una vez que los quistes de *Haematococcus* estuvieron en el agua destilada se realizaron siembras en tubos con medio MBB 3N y en placas con agar. Este procedimiento se repitió hasta obtener un cultivo monoalgal del que partieron el resto de los cultivos en medio líquido.

### 2.3. Optimización del cultivo para producción de biomasa

#### 2.3.1. Cultivo con diferentes temperaturas e intensidades de luz

El proceso para obtener las mejores condiciones de cultivo para la producción de biomasa de *Haematococcus* sp. inició con la evaluación de diferentes temperaturas (21, 23 y 25 °C) e intensidades de

luz (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), con tres repeticiones por cada tratamiento de cultivo. El medio utilizado fue el MBB 3N. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer con capacidad de 150 mL, con 100 mL de cultivo, iniciando con un inóculo de  $3 \times 10^3$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . Estos se mantuvieron en una cámara climática marca ShellLab® (modelo SRIM21D), con un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas.

Para los cultivos se utilizó agua destilada previamente esterilizada a 120 °C, a 15 libras de presión por 15 minutos. Posteriormente fue enriquecida con los macro y micronutrientes del medio MBB 3N (Tabla 1), metales traza y vitaminas (medio "f/2").

**Tabla 1.-** Concentración de los componentes mayores del Medio Basal Bold 3N (UTEX, The Culture Collections of Algae).

<b>Nutriente</b>	<b>Concentración final en el medio (mM)</b>
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	8.82
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0.17
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.3
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.43
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.29
<b>NaCl</b>	0.43

El crecimiento de *Haematococcus* en los cultivos se evaluó por medio del incremento en la biomasa celular (cél  $\text{mL}^{-1}$ ). Los recuentos celulares diarios se realizaron con un hematocitómetro (cámara de Neubauer) con 0.1 mm de profundidad, utilizando un microscopio compuesto (Marca: Primo star, Carl Zeiss). Además, se estimó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y el tiempo de generación.

### **2.3.2. Cultivo con diferentes medios enriquecidos**

Una vez obtenidos los resultados de crecimiento del primer experimento, se realizó una segunda evaluación para continuar con la optimización de la producción de biomasa. En esta segunda evaluación se probaron diferentes temperaturas: 21, 23 y 25 °C, en dos medios de cultivo MBB 3N y Plantafol (fertilizante agrícola), a una intensidad de luz de  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con fotoperiodo luz: oscuridad 12:12 horas, en un volumen de cultivo mayor. De igual manera, en esta evaluación los cultivos se mantuvieron en una cámara climática.



Los cultivos de *Haematococcus* sp. se realizaron en botellas con capacidad para 1000 mL (marca Pyrex), con 500 mL de volumen útil, se inició con un inóculo de  $3 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>, en cada tratamiento se tuvieron tres repeticiones. Se utilizó agua destilada previamente esterilizada siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente. Los medios de cultivo se prepararon con la misma concentración de nitrógeno para ambos tratamientos, considerando como referencia el contenido en el medio MBB 3N, de 8.82 mM de N<sub>2</sub>.

Cómo parte de la evaluación de los cultivos, se realizaron recuentos celulares diarios, se calculó la tasa de crecimiento específica y el tiempo de generación. Las muestras se filtraron con filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, con 47 mm de diámetro y 1.2 µm de retención de partículas, los cuales fueron previamente lavados, calcinados y pesados. Los filtros con las microalgas retenidas fueron colocados en una estufa (Marca: Thermolyne, modelo: Oven series 9000) a 70 °C por 24 h, y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco total (PST), después, estos filtros se colocaron en una mufla a 490 °C por 12 h, posteriormente se pesaron para obtener el peso de cenizas y, por diferencia entre el PST y las cenizas, se obtuvo el peso orgánico (PO).

## **2.4. Inducción a la carotenogénesis**

Una vez seleccionadas las condiciones de cultivo para la mejor producción de biomasa, se inició con los bioensayos para la inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp., donde se evaluaron: a) altas intensidades de luz, b) el efecto interactivo de diferentes concentraciones de salinidad y altas intensidades de luz y, c) limitación de nutrientes y altas intensidades de luz.

### **2.4.1. Inducción con altas intensidades de luz**

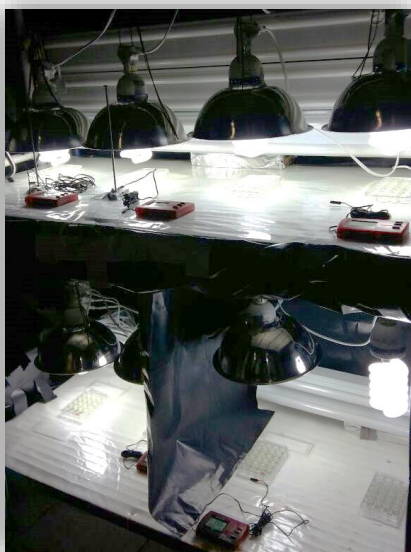
El primer experimento se realizó probando el efecto de altas intensidades de luz, combinado con la eliminación de todos los nutrientes en el medio de cultivo.

Se utilizó un sistema de cultivo establecido por Zepeda-Lupio (2015) (Figura 2) con ocho intensidades de luz: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, utilizando lámparas fluorescentes Sanlight® de 6500 kelvin, de 65 watts. Las lámparas fueron colocadas en el centro de una campana de aluminio que favoreció la focalización de la luz. Para conseguir las diferentes intensidades de luz, las lámparas se posicionaron a diferentes distancias del punto focal. La temperatura se midió de forma constante con

termómetros marca Sper Scientific®, y se mantuvo a  $24.6 \pm 1.1$  °C, la cual fue controlada por medio de ventiladores eléctricos colocados al extremo de cada nivel del sistema de cultivo.

El experimento se llevó a cabo en placas de cultivo de 24 pozos (marca Costar® Mod.3527). La biomasa celular empleada en este experimento se centrifugó (para remover el remanente de nutrientes) en un equipo Thermo Fisher Scientific (modelo Heraeus Megafuge 16R) a 2500 rpm, y se resuspendió en un volumen conocido de agua destilada estéril y sin nutrientes. Las placas se inocularon con 2.5 mL de cultivo, con una densidad inicial de  $190 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>, en su fase biflagelada. Se inocularon un total de 16 pozos por placa (n= 16).

La evaluación se extendió por un lapso de 4 días (día 0-3). Debido a la evaporación que se presentó en las placas, el volumen de cada pozo se completó diariamente con agua destilada.



**Figura 2.-** Sistema utilizado para las pruebas de inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. Cuenta con ocho lámparas fluorescentes de luz blanca, cada lámpara tiene un punto focal para alcanzar las diferentes intensidades de luz: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600 (Zepeda-Lupio, 2017).

Con los resultados obtenidos de este experimento se pudo acotar que las intensidades de luz de 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  son las que favorecieron la inducción a la carotenogénesis, sin causar daño celular, mientras que el resto de las condiciones de luz provocaron rompimiento celular y, por ende, liberación de los pigmentos al medio.

### 2.4.2. Inducción con salinidad y luz

El segundo experimento se realizó empleando las intensidades de luz con los mejores resultados de inducción a la carotenogénesis obtenidas en el experimento previo, en conjunto de un gradiente de salinidades: 0 (control), 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M de NaCl.

Para preparar los medios con las diferentes salinidades se utilizaron 5 matraces Erlenmeyer con capacidad de 150 mL con un volumen útil de 100 mL de agua destilada, se añadió NaCl para cada una de las cuatro concentraciones, más el control (al cual no se le añadió sal). Posteriormente los medios se esterilizaron a 120 °C, a 15 libras de presión por 15 minutos, después se añadió el medio de cultivo MBB 3N, más las vitaminas y metales traza.

La biomasa celular utilizada en este bioensayo fue centrifugada y resuspendida en cada uno de los medios preparados previamente. Se utilizó una placa de cultivo para cada intensidad de luz (100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y se inocularon 4 pozos por cada salinidad (n= 4), para un total de 20 pozos por placa.

El inóculo inicial de *Haematococcus* sp. en los pozos fue de  $190 \times 10^3$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , en 2.5 mL de cultivo. El experimento se mantuvo por un lapso de 4 días (día 0-3). Diariamente se resuspendieron las células adheridas a las paredes y fondo de los pozos con ayuda de una pipeta Pasteur. Posteriormente se recuperó el volumen perdido por la evaporación con agua destilada estéril. Por último, con la finalidad de poder observar el cambio en la composición de los pigmentos en los cultivos a través del tiempo, se tomó una muestra de 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de cada uno de los pozos en las repeticiones de cada tratamiento, y se colocaron en microplacas de 96 pozos, con fondo de cuarzo (marca Costar® Mod. 9017), se analizaron las absorbancias en un lector de placa modelo Varioskan Flash (marca ThermoScientific®), realizando un barrido de longitud de onda de 350 a 750 nm.

### 2.4.3. Experimentación con limitación de nutrientes y luz

El siguiente experimento sobre la inducción de *Haematococcus* sp. comprendió la evaluación de las altas intensidades de luz probadas en los experimentos previos, en conjunto con la limitación de nutrientes en el medio de cultivo, y su efecto sobre la inducción a la carotenogénesis.

Para elaborar este bioensayo se utilizaron 4 matraces Erlenmeyer con capacidad de 150 mL, con 100 mL de agua destilada, se esterilizaron a 120 °C, a 15 libras de presión por 15 minutos. Se utilizó el medio MMB 3N, con la concentración correspondiente de  $\text{NaNO}_3$ : 0, 50, 75 y 100% del total de  $\text{NaNO}_3$ .

El inóculo de *Haematococcus* sp. utilizado para este bioensayo se centrifugó con el procedimiento antes descrito y se resuspendió en cada uno de los matraces con los medios limitados en nutrientes. Se utilizaron 4 placas de cultivo de 24 pozos, una por cada intensidad de luz a evaluar (100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), se inocularon 4 pozos (repeticiones) por cada una de las concentraciones de nutrientes, para un total de 16 pozos por placa y 16 tratamientos a probar.

El inóculo utilizado fue de  $190 \times 10^3$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , con un volumen de 2.5 mL por pozo. Diariamente se resuspendieron las células adheridas a las paredes de la placa de cultivo. Debido a la evaporación se completó el volumen inicial en cada uno de los pozos de las placas con agua destilada estéril.

El experimento se mantuvo por un lapso de 4 días (día 0-3), durante los cuales se tomó una muestra de 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de cada uno de los tratamientos y sus réplicas, a los que se les realizó un barrido de absorbancia por espectrofotometría a longitud de onda de 350 a 750 nm en lector de placa, utilizando microplacas de cultivo de 96 pozos con fondo de cuarzo. Esto con la finalidad de observar los cambios en la composición de los pigmentos de los cultivos.

#### **2.4.4. Inducción por salinidad, nutrientes y luz**

El experimento final se planificó con base en los resultados de los ensayos previos, seleccionando 3 salinidades, 2 concentraciones de limitación de nutrientes y una intensidad de luz que, en vista de los resultados, fueron las mejores condiciones para la producción de pigmentos carotenoides; estas condiciones se eligieron para evaluar la interacción de éstos factores en un determinado tiempo.

Se utilizaron 18 botellas con capacidad para 500 mL, con tapones de algodón y varillas para aireación, cada botella con 350 mL de agua destilada. Se añadió NaCl para conseguir las salinidades de 0.034 y 0.25 M en los respectivos tratamientos y posteriormente todas las botellas fueron esterilizadas.

La evaluación de los nutrientes se realizó con las concentraciones de 0% y 100% de  $\text{NaNO}_3$  (del medio MBB 3N). El inóculo inicial fue de 1350 cél  $\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se designaron 6 tratamientos en total, cada tratamiento se realizó por triplicado.

La intensidad de luz fue de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca marca Phillips®. La temperatura se mantuvo en  $24 \pm 1$  °C, la cual se midió con un termómetro de máximos y mínimos.

El experimento se mantuvo por 15 días (día 0 al 14), diariamente se recolectaron 10 mL de cultivo para realizar el análisis de pigmentos. Además, en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14 se tomaron 10 mL de cultivo extras para determinar el peso seco total y orgánico. Las muestras para el análisis de pigmentos se colocaron en tubos estériles de 10 mL, posteriormente se centrifugaron durante 15 min a 2500 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el paquete celular se almacenó a -21°C para su posterior análisis de pigmentos.

## 2.5. Extracción de pigmentos carotenoides

El paquete celular de cada una de las muestras que fueron almacenadas previamente, se resuspendió en agua destilada y se transfirió a microtubos de silicón (marca VWR®), se centrifugó (a 10 000 rpm durante 5 min) para compactar la muestra nuevamente y así retirar el sobrenadante. Previamente se agregó a cada microtubo 0.20 g de perlas de zirconia/sílica de 0.5 mm (marca BioSpec). A cada microtubo con muestra se le agregó 1.5 mL de metanol grado HPLC.

La extracción de pigmentos se realizó por medio de rompimiento mecánico de las células. Para esto, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido a -196 °C por 15 min, y posteriormente se agitaron por 8 min (cada una) utilizando un Bead beater (marca BioSpec). La agitación se repitió hasta que la biomasa celular tuviera un color blanco, después se centrifugó nuevamente.

El metanol con los pigmentos de cada muestra se filtró individualmente a 0.1 µm, y se obtuvo un volumen final de extracción de 1.75 mL, que se colocó en viales de vidrio de 2 mL color ámbar (HP®) para la lectura en HPLC.

## 2.6. Análisis de pigmentos por HPLC

Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, marca Agilent Technologies®, modelo: 1260 INFINITY), equipado con un detector de diodos. Se empleó una columna de fase-reversa C8 de 4.5 x 150 mm (marca Agilent Technologies, modelo Zorbax), con un tamaño de partícula de 5 µm. La columna se mantuvo a 30 °C durante su funcionamiento.

El método utilizado fue de acuerdo al descrito por Orosa *et al.* (2005) modificando los porcentajes de la fase móvil. El gradiente de dilución (Tabla 2) consistió en la mezcla de agua (eluyente A), metanol (eluyente B), y acetona (eluyente C) en relación V:V:V, con un flujo de 0.5 mL por minuto.

**Tabla 2.-** Gradiente de dilución de la fase móvil en el análisis de pigmentos en HPLC.

Minuto	A %	B %	C %
<b>0</b>	15	76	9
<b>9</b>	50	45	5
<b>15</b>	58	38	4
<b>17</b>	70	27	3
<b>22</b>	70	27	3
<b>25</b>	100	0	0
<b>26</b>	100	0	0
<b>29</b>	15	76	9

Los solventes orgánicos utilizados para preparar la fase móvil fueron grado HPLC y, como medida preventiva, fueron pasados por filtros de teflón de 0.45 µm.

Los estándares empleados para la identificación de los pigmentos fueron: astaxantina (asta-105), luteína (lut-130), cantaxantina (cant-131), clorofila  $\alpha$ , y  $\beta$ -caroteno (beta-127) (DHI® Dinamarca). Se utilizó un volumen de inyección de 20 µl para los estándares, y 5 µl para cada una de las muestras del extracto de microalgas.

## 2.7. Cálculo del contenido de pigmentos en *Haematococcus* sp.

Se realizaron curvas de calibración con los diferentes estándares de pigmentos, tomando como referencia la concentración inicial de cada estándar ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), así como el área de los picos en los cromatogramas y la serie de diluciones correspondientes. El cálculo del contenido de pigmento se realizó en ng de pigmento por  $\text{mg}^{-1}$  de peso seco ( $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) utilizando la fórmula de Hooker y Heukelem (2011):

$$C_p = \frac{V_x}{m_{g_{ps}}} \times \frac{C_l}{V_c}$$

dónde:

$C_p$ = concentración de pigmento ( $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ )

$V_x$ = volumen de metanol para extracción ( $\mu\text{l}$ )

$m_{g_{ps}}$ = mg de peso seco de la muestra

$C_l$ = cantidad de pigmento inyectado

$V_c$ = volumen inyectado en HPLC

## 2.8. Análisis y procesamiento de datos

Para evaluar el efecto de los diferentes medios de cultivo, las intensidades de luz y las diferentes temperaturas sobre la densidad celular de *Haematococcus* sp., así como las pruebas de inducción a la carotenogénesis, se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Se realizaron pruebas de Shapiro will para comprobar la normalidad, y prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas de los datos. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, fueron transformados con la función  $\log_{10}$ .

En los experimentos de crecimiento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de 0.05. El primer experimento consideró los factores luz y temperatura, el segundo temperatura y medio de cultivo.

En los experimentos de inducción a la carotenogénesis se realizó ANOVA de dos vías para la evaluación del efecto de la limitación de nutrientes y diferentes intensidades de luz, así como sus interacciones. Se realizó un segundo ANOVA de dos vías para la evaluación del efecto de la luz en combinación de las diferentes salinidades. Cuando hubo diferencias significativas se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey.

El experimento final de inducción no cumplió con los supuestos de normalidad aún después de haber sido transformados, y se realizó un análisis de Kruskal Wallis. Siempre utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

Para realizar todos los análisis se utilizó el paquete estadístico Statistica Soft10®.

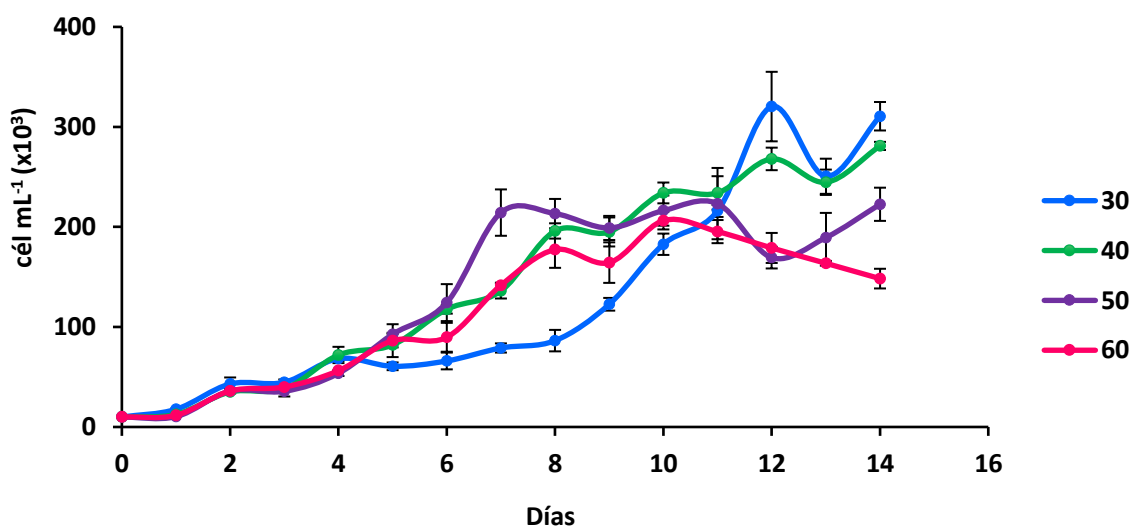
## Capítulo 3. Resultados

### 3.1. Evaluación de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo

#### 3.1.1. Crecimiento de *Haematococcus* sp. en diferentes temperaturas e intensidades de luz

Los resultados de las densidades celulares, obtenidas en el primer ensayo de crecimiento en *Haematococcus* sp. que consistió en la evaluación de 3 temperaturas, en combinación con 4 intensidades de luz, se muestran en las figuras 3, 4 y 5. Para este experimento se utilizó un DCA y se realizó un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA 2 vías), para estudiar el efecto de los factores luz y temperatura, así como sus interacciones, sobre la densidad celular *Haematococcus* sp. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis *a posteriori* de Tukey, siempre con una significancia de 0.05.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a 21°C a partir del 6 de cultivo ( $p < 0.05$ ). En el día siete, las densidades en el tratamiento con  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ), con biomasa de  $214.3 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  y los valores más bajos fueron observados en la intensidad de luz de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con  $79 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, este último cultivo se recuperó, y en el día 12 presentó la mayor densidad celular promedio alcanzando hasta  $320 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , similares a las del tratamiento de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $268 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ), y con diferencias altamente significativas a las obtenidas en los tratamientos de 50 y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), donde se obtuvieron los menores valores. Esta tendencia se mantuvo en el último día de cultivo (Figura 3).



**Figura 3.-** Crecimiento de la microalga *Haematococcus* sp. ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultivada a 21°C, con diferentes intensidades de luz (30, 40, 50 y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

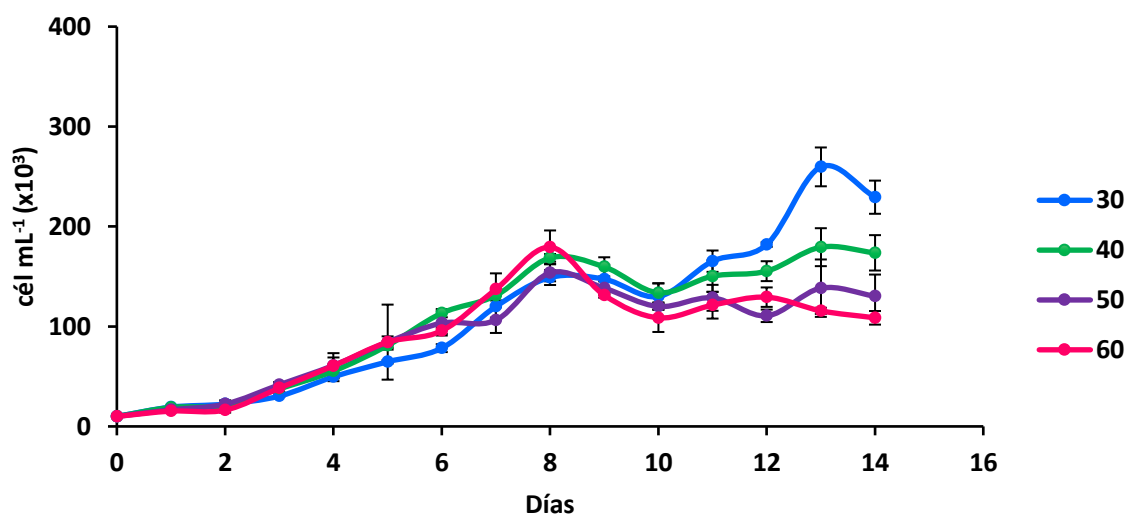


Igualmente, en el día 12 el cultivo a  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  no fue diferente de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $268 \pm 11 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $p>0.05$ ). Finalmente, el menor número de células al día 14 se obtuvo con de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , obteniendo  $148 \pm 9 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 3).

Las densidades celulares de los tratamientos a  $23^\circ\text{C}$  se muestran en la figura 4. En el desarrollo de este trabajo, hasta el onceavo día de cultivo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p>0.05$ ). En el día 13, en el cultivo a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se obtuvo la mayor densidad ( $260 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y ésta fue diferente de los otros tratamientos ( $p<0.001$ ).

Los cuatro tratamientos con las diferentes intensidades de luz, detuvieron su crecimiento entre los días siete y ocho, con densidades similares en todos los tratamientos ( $p>0.05$ ), con concentraciones máximas de  $179 \times 10^3$  y  $153 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  con los tratamientos con  $40$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  respectivamente (figura 4).

En el último día de cultivo, aunque se presentó un decaimiento de la densidad en el tratamiento a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la biomasa ( $229 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue mayor que en los otros tratamientos, mientras que la menor biomasa ( $108 \times 10^3$   $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue en el tratamiento con  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p<0.001$ ).

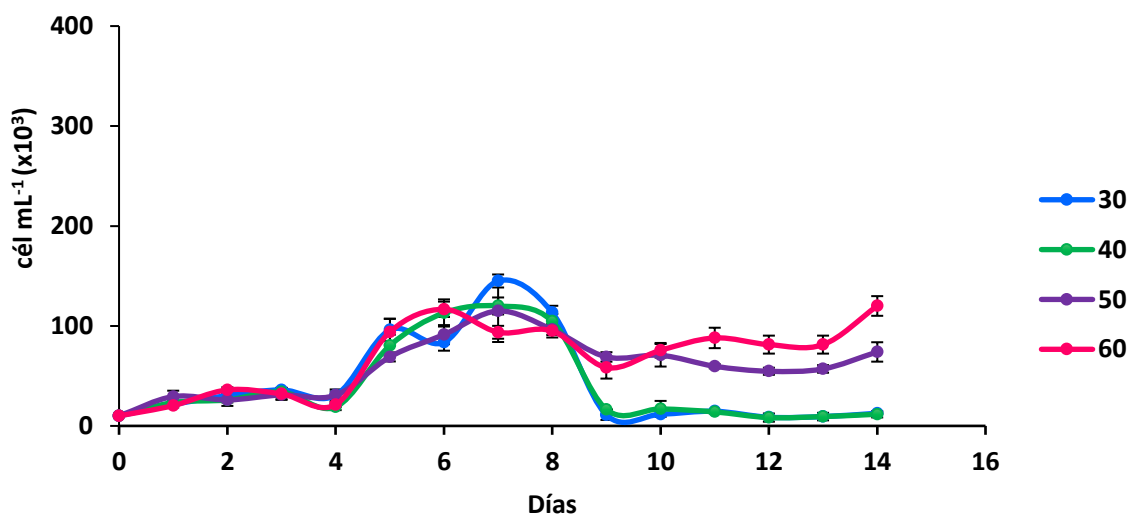


**Figura 4.-** Crecimiento de la microalga *Haematococcus* sp. ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultivada a  $23^\circ\text{C}$ , con diferentes intensidades de luz ( $30$ ,  $40$ ,  $50$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

La figura 5 muestra las densidades celulares de *Haematococcus* sp. cultivada a  $25^\circ\text{C}$ , en las intensidades de luz de  $30$ ,  $40$ ,  $50$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se puede observar que solo en el día 1 tuvieron crecimiento

exponencial, con una tasa de crecimiento promedio ( $\mu$ ) de  $1.2 \pm 0.13$ , y alcanzaron  $33 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sin diferencias estadísticas entre los cuatro tratamientos ( $p>0.05$ ). Al día 7, se obtuvieron las máximas densidades en los tratamientos con  $30, 40$  y  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con densidades alrededor de las  $119 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $p>0.05$ ). A partir del día 9 se observaron decaimientos pronunciados de las biomásas en los tratamientos de  $30$  y  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con densidades casi similares a las densidades iniciales que se mantuvieron hasta el final del cultivo ( $11 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

La concentración celular de los cuatro tratamientos disminuyó el día 9. El tratamiento con  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  disminuyó su densidad de  $84 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $17 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , alcanzando densidades cercanas a las del cultivo a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p>0.05$ ), que se mantuvieron similares hasta el día 14. La mayor densidad obtenida bajo  $25^\circ\text{C}$  fue de  $120 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con el tratamiento a  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en el día 14. Sin embargo, se obtuvieron  $145 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  con  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en el día 7 (Figura 5).



**Figura 5.-** Crecimiento de la microalga *Haematococcus* sp. ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultivada a  $25^\circ\text{C}$ , con diferentes intensidades de luz ( $30, 40, 50$  y  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

Finalmente, como resultados de este ensayo se observó que *Haematococcus* sp. alcanzó mayores densidades celulares en la temperatura de  $21^\circ\text{C}$ , mientras que la mejor condición de luz fue  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p<0.01$ ) obteniendo hasta  $320 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 3). La densidad máxima a  $23^\circ\text{C}$  fue de  $260 \times 10^3$

cél·mL<sup>-1</sup>, con la misma intensidad de luz de 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Mientras que los cultivos a 25°C no presentaron buen crecimiento, y de acuerdo con el análisis de varianza, esta temperatura afectó significativamente el número de células, con densidades menores al resto de los tratamientos en 21 y 23°C a partir del noveno día y hasta el día 14 ( $p<0.001$ ) (Figura 5).

Los cultivos que se mantuvieron a 21°C iniciaron la fase de crecimiento exponencial en el día dos en las intensidades de luz de 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con tasas de crecimiento ( $\mu$ ) de 1.25 a 1.80 div·día<sup>-1</sup> (Tabla 3), mientras que en el tratamiento a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  comenzó la fase exponencial desde el día uno después de la inoculación, con una  $\mu$  de 0.82 div·día<sup>-1</sup>. Los tratamientos a 23°C en las cuatro intensidades de luz iniciaron el crecimiento exponencial el día uno, con valores de 0.61 a 0.95 div·día<sup>-1</sup> y continuaron hasta el día cuatro. La fase de crecimiento exponencial en los cultivos a 25°C se presentó en el día uno (1 a 1.50 div·día<sup>-1</sup>) y cinco (1.22 a 2.13 div·día<sup>-1</sup>).

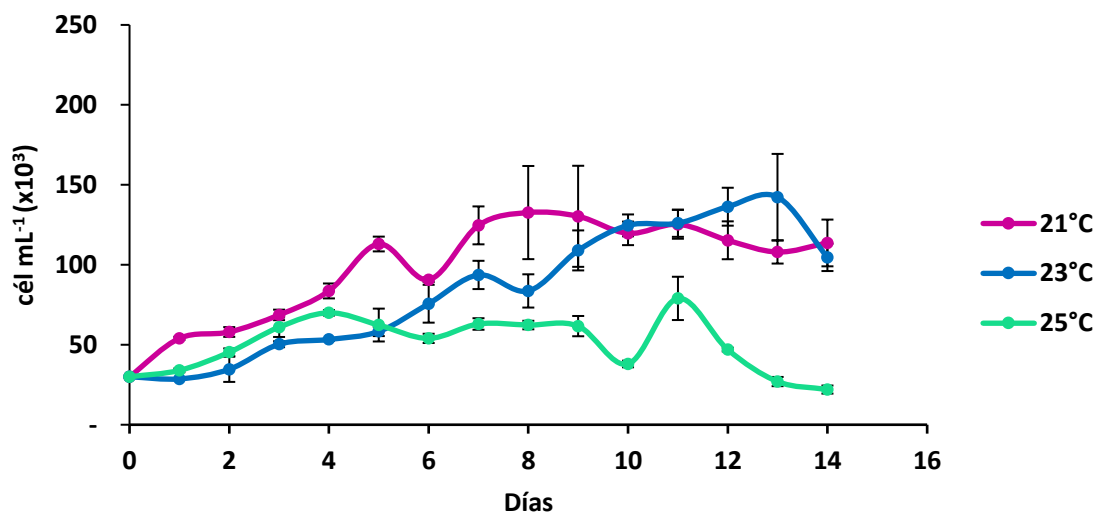
**Tabla 3.-** Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ , divisiones·día<sup>-1</sup>) de *Haematococcus* sp., cultivada en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y cuatro intensidades de luz (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en Medio Basal Bold 3 N.

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$	21°C				23°C				25°C			
	30	40	50	60	30	40	50	60	30	40	50	60
Día												
1	0.82	0.34	0.05	0.21	0.95	0.91	0.73	0.61	1.09	1.21	1.50	1.01
2	1.25	1.47	1.80	1.63	0.17	0.15	0.43	0.08	0.50	0.15	-0.19	0.83
3	0.08	0.12	-0.04	0.14	0.48	0.84	0.90	1.23	0.26	0.38	0.29	-0.21
4	0.62	0.91	0.62	0.51	0.70	0.55	0.53	0.65	-0.25	-0.87	-0.04	-0.56
5	-0.18	0.17	0.77	0.61	0.39	0.57	0.48	0.37	1.65	2.10	1.22	2.13
6	0.10	0.55	0.41	0.03	0.27	0.49	0.28	0.31	-0.19	0.50	0.39	0.34
7	0.28	0.21	0.80	0.70	0.61	0.21	0.04	0.52	0.80	0.10	0.21	-0.32
8	0.11	0.53	0.00	0.31	0.32	0.37	0.55	0.39	-0.36	-0.20	-0.12	0.02
9	0.52	-0.01	-0.10	-0.12	-0.03	-0.08	-0.15	-0.45	-3.65	-1.41	-0.48	-0.75
10	0.57	0.27	0.12	0.35	-0.18	-0.26	-0.20	-0.28	0.37	-1.50	0.00	0.41
11	0.25	0.00	0.02	-0.08	0.36	0.16	0.09	0.16	0.33	0.00	-0.21	0.21
12	0.55	0.20	-0.37	-0.13	0.14	0.06	-0.21	0.10	-0.79	-1.19	-0.13	-0.11
13	-0.34	-0.13	0.14	-0.12	0.51	0.20	0.26	-0.16	0.12	0.32	0.06	0.00
14	0.31	0.20	0.25	-0.15	-0.18	-0.05	-0.06	-0.09	0.46	0.50	0.36	0.57

### 3.1.2. Crecimiento de *Haematococcus* sp. en diferentes medios de cultivo y temperaturas

La segunda evaluación de crecimiento de *Haematococcus* sp. se realizó probando dos medios de cultivo: el medio Basal Bold (MBB) y el fertilizante agrícola Plantafol (PL), así como las 3 temperaturas evaluadas en el bioensayo previo: 21, 23 y 25 °C. Estos medios de cultivo se evaluaron a una intensidad de luz menor que en los experimentos anteriores:  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , debido a que no se alcanzaron las densidades celulares esperadas. La densidad inicial de cultivo fueron  $30 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en un volumen útil de 300 mL. Para este experimento se utilizó un DCA y se realizó un ANOVA 2 vías, para estudiar el efecto de los factores temperatura y medio de cultivo, así como sus interacciones, sobre la densidad. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis *a posteriori* de Tukey, siempre con una significancia de 0.05.

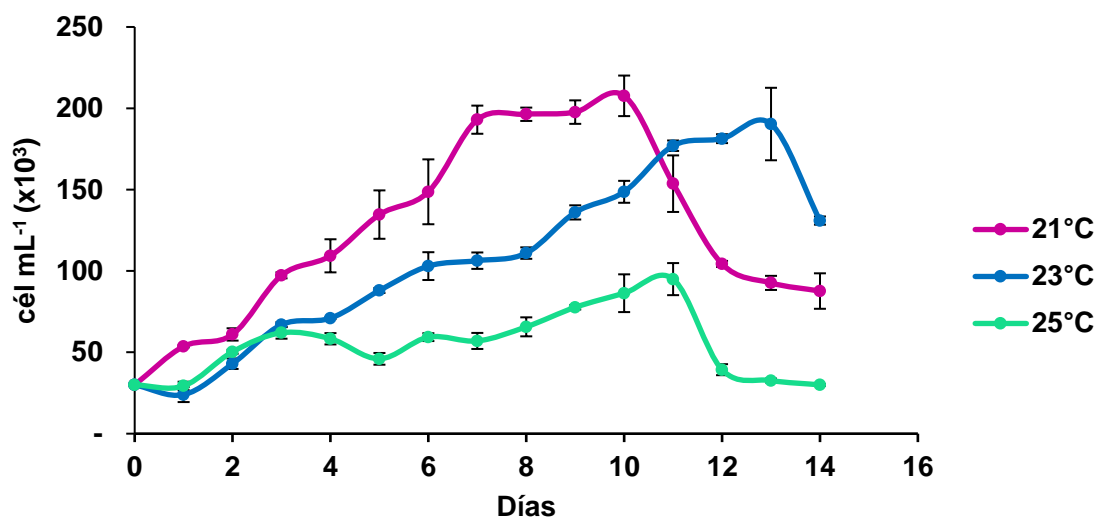
Las densidades celulares del cultivo de *Haematococcus* sp. en MBB 3N, bajo las tres temperaturas se encuentran en la figura 6. Durante los primeros cuatro días de cultivo la menor densidad se obtuvo a 23°C ( $53 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el día 4), pero no hubo diferencias entre los cultivos a 21 y 25 °C ( $p < 0.05$ ) (con  $83 \times 10^3$  y  $70 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente). Sin embargo, el cultivo a 23°C se recuperó notablemente y obtuvo las densidades más altas el día 13 con  $142 \pm 46 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 6).



**Figura 6.-** Crecimiento de *Haematococcus* sp. ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultivada en el Medio Basal Bold 3N (MBB), en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C), a  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

En el caso del medio PL (Figura 7) la mayor densidad se obtuvo a 21°C, con  $207 \pm 12 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el día 10 de cultivo, posteriormente decreció la biomasa paulatinamente hasta  $88 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el día 14.

Al final de la evaluación en los cultivos a 21 y 23°C obtuvieron  $131 \times 10^3$  y  $87 \times 10^3$  cél·mL<sup>-1</sup>. Mientras que las menores densidades las obtuvo el cultivo a 25°C, al igual que en el cultivo con MBB, y obtuvo un máximo de  $95 \times 10^3$  cél·mL<sup>-1</sup> al onceavo día (Figura 7).



**Figura 7.-** Crecimiento de *Haematococcus* sp. (cél·mL<sup>-1</sup>) cultivada con el fertilizante agrícola Plantafol (PL) en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C), a  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican el error estándar (n=3).

De acuerdo con el análisis de varianza, la temperatura y el medio de cultivo tuvieron un efecto sobre el cultivo de *Haematococcus* ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ , respectivamente). No hubo diferencias significativas entre el número de células a 21 y a 23 °C ( $p > 0.05$ ) al realizar el cultivo con MBB.

El número de células obtenido fue mayor en los tratamientos en PL, y significativamente diferentes de los cultivos en MBB ( $p < 0.001$ ) (Figuras 6 y 7). El análisis de varianza mostró las densidades mayores que se obtuvieron en el medio PL son resultado de un efecto interactivo ( $p < 0.001$ ).

En cuanto a las tasas de crecimiento, se observó que a 21°C se presentó la fase de crecimiento exponencial el primer día después de la inoculación ( $0.85$  y  $0.84$  div·día<sup>-1</sup> en MBB y PL respectivamente), con una duración de un día. Posteriormente comienza la fase de lento crecimiento y continúa hasta el día 9, donde inicia el decaimiento para MBB ( $\mu = -0.04$ ) y el día 10 para PL ( $\mu = 0.07$ ). A partir del día 3 se observaron tasas de crecimiento negativas en todos los tratamientos (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ , divisiones·día<sup>-1</sup>) de *Haematococcus* sp., cultivada en tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y dos medios de cultivo (Medio Basal Bold 3N y fertilizante agrícola Plantafol), con una intensidad de luz de 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

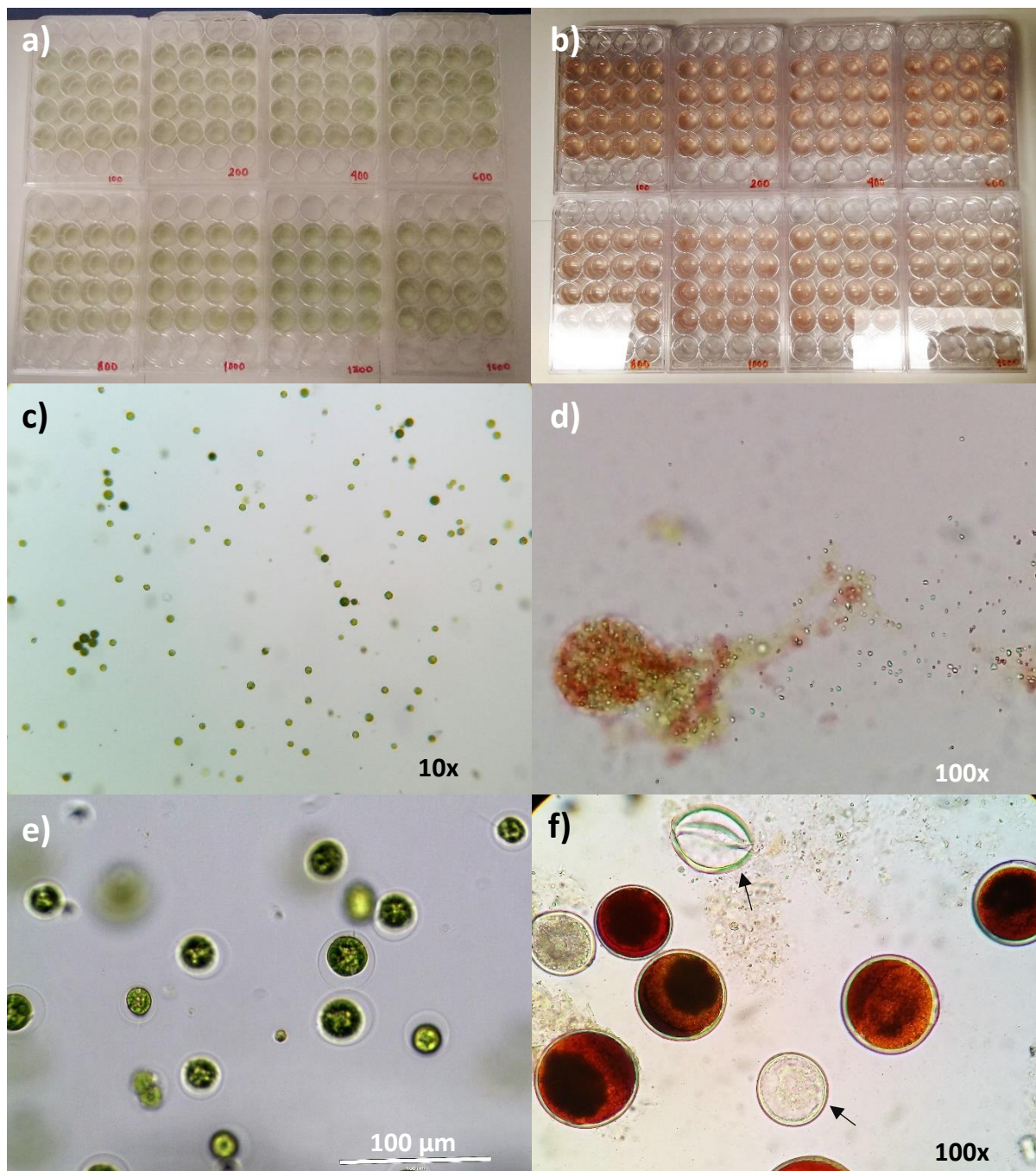
Medio	21°C		23°C		25°C	
	MBB	PL	MBB	PL	MBB	PL
Día						
1	0.85	0.84	-0.07	-0.37	0.18	-0.04
2	0.10	0.18	0.18	0.88	0.41	0.79
3	0.24	0.68	0.63	0.65	0.42	0.30
4	0.28	0.15	0.09	0.08	0.21	-0.09
5	0.44	0.30	0.13	0.31	-0.21	-0.35
6	-0.32	0.14	0.34	0.22	-0.17	0.37
7	0.45	0.40	0.33	0.05	0.22	-0.07
12	-0.13	-0.54	0.11	0.04	-0.70	-1.27
13	-0.09	-0.10	-0.40	-0.52	-0.30	-0.12
14	0.05	-0.10	-0.40	0.52	-0.30	-0.12

## 3.2. Inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. por salinidad, nutrientes y luz

### 3.2.1. Evaluación de la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz

El primer experimento de inducción a la carotenogénesis se realizó probando 8 intensidades de luz (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) sobre el cultivo *Haematococcus*. Esto se realizó en placas de cultivo (24 pozos) por un periodo de 4 días (día 0-3) (Figura 8, a y b). Al último día de cultivo se recolectó una muestra de los diferentes tratamientos (n=16) para ser observada en microscopio y conocer que tratamientos provocaron la acumulación de pigmentos carotenoides.

De acuerdo con las observaciones realizadas, en los tratamientos con 800, 1000, 1300 y 1600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se encontraron células con la pared celular rota. Este daño celular provocó la liberación de los pigmentos al medio, lo que dificultó la recolecta de microalgas y, por ende, la cuantificación de los carotenoides (Figura 8, d).



**Figura 8.-** Placas de cultivo con *Haematococcus* sp. que fueron expuestas a ocho intensidades de luz. El orden en que aparecen las placas, de izquierda a derecha, son de la menor a la mayor intensidad de luz. a) placas de cultivo al día 0, b) placas de cultivo al día tres, c) células en el día 0 (objetivo 10x); d) célula con pared rota (liberando los pigmentos al medio), en el día 3 y con una intensidad de luz de  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; e) células de *Haematococcus* sp. en su fase vegetativa, y f) células de *Haematococcus* sin material celular dentro (↗) y aplanosporas (color rojo), obtenidas en los tratamientos de  $800, 1000, 1300$  y  $1600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En las intensidades de luz 100 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  no se observó la formación de células con acumulación completa de pigmentos carotenoides (aplanosporas), ya que las células únicamente mostraban el color rojo en el centro, además se observó un gran número de células flageladas verdes y microzoides. Los tratamientos con 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  permitieron la acumulación de pigmentos carotenoides sin ocasionar daño en la pared celular. Con base en estas observaciones se decidió que las intensidades de luz 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se usarían para la siguiente evaluación de inducción a la carotenogénesis. En la figura 8 aparecen las células flageladas en color verde, que se fotografiaron en el día 0 del experimento (e), y se contrastan con las células en fase de aplanosporas que fueron obtenidas en los cultivos a mayores intensidades de luz (f).

### **3.2.2. Evaluación de la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz y concentraciones de nutrientes**

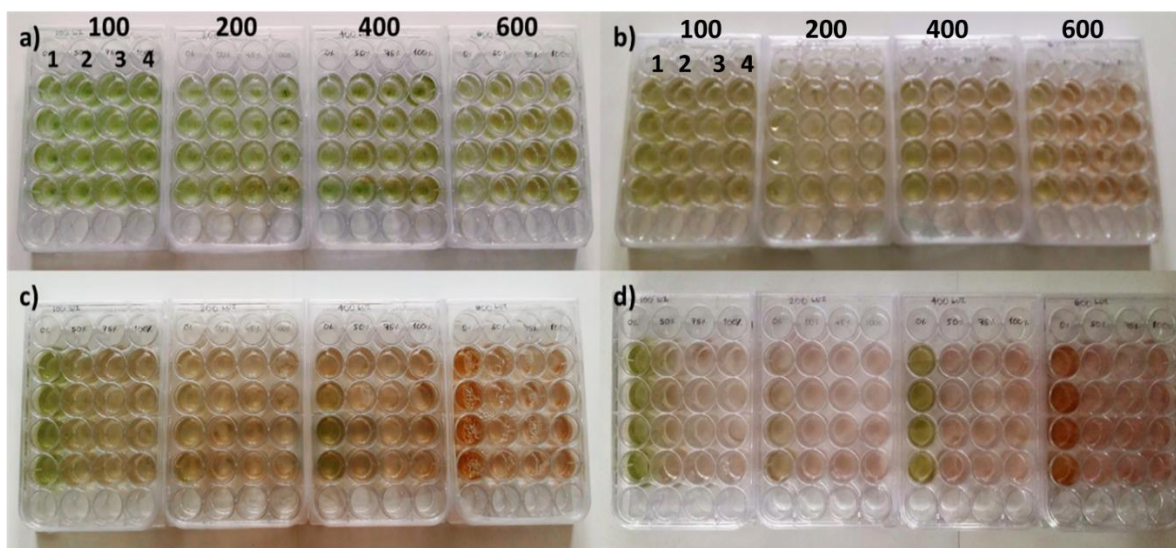
La siguiente evaluación de inducción se realizó empleando las 4 intensidades de luz seleccionadas anteriormente (100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en combinación con la limitación de los nitratos. Se eligieron 4 condiciones de nutrientes: 0, 50, 75 y 100 % de  $\text{NaNO}_3$ , con base en los 8.82 mM de  $\text{NaNO}_3$  presentes en el medio MBB 3N. Para este experimento se utilizó un DCA y se realizó un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA 2 vías), para estudiar el efecto de la limitación de nutrientes y las altas intensidades de luz, así como sus interacciones sobre la producción de pigmentos carotenoides. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis *a posteriori* de Tukey, siempre con una significancia de 0.05.

La figura 9 contiene imágenes de las 4 placas de cultivo utilizadas para la inducción durante los cuatro días de evaluación. Es evidente el cambio de coloración del día 0 con respecto a los días 3 y 4. El tratamiento con mayor pigmentación roja fue el de 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con 0% de  $\text{NaNO}_3$ . Mientras que los tratamientos que no presentaron cambios en la coloración durante su evaluación fueron 100 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con 0% de  $\text{NaNO}_3$  (Figura 9).

Para corroborar los resultados visuales e identificar que tratamientos obtuvieron el mayor contenido del pigmento, se midió la absorbancia de astaxantina a 476 nm de longitud de onda. Los resultados de absorbancia de cada tratamiento en los diferentes días de cultivo (0-4) se encuentran resumidos en la tabla 5.



Los valores de absorbancia aumentaron alrededor del 100% del día 0 al día 4 de la evaluación. De acuerdo al análisis de varianza, en el día 2 no se presentaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos ( $p>0.05$ ). Los días 3 y 4, los tratamientos con 0 y 100 % de nitratos con las intensidades de luz de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  tuvieron los valores de absorbancia similares entre ellos ( $p>0.05$ ), pero con diferencias significativas de los valores obtenidos con 100 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con las mismas condiciones de nutrientes ( $p<0.05$ ) (Tabla 5).



**Figura 9.-** Placas de cultivo de *Haematococcus* sp. para evaluar la inducción a la carotenogénesis en cuatro intensidades de luz: 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en combinación con cuatro condiciones de nutrientes: 0% (1), 50% (2), 75% (3) y 100% (4). Días de cultivo: 0 (a), 1 (b), 3 (c) y 4 (d). Experimento con 16 tratamientos ( $n= 4$ ).

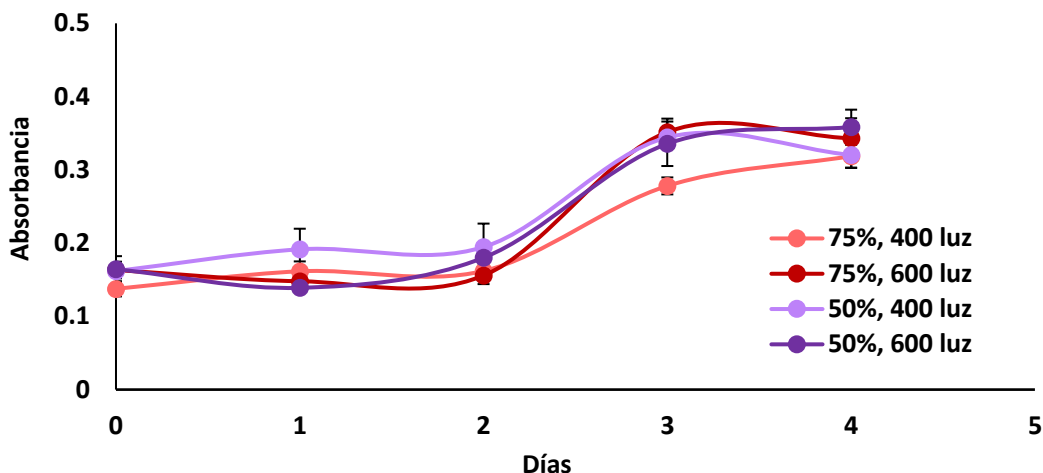
Al cuarto día, el mayor valor de absorbancia (0.389 ua), se obtuvo con la intensidad de luz de 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en combinación con 50% de nitrógeno, que fue diferente al resto de los tratamientos ( $p<0.05$ ), sin embargo, este resultado es similar a los obtenidos en el día 3 para las intensidades de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Tabla 5).

Las intensidades de luz donde no se observó inducción (100 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se descartaron, eliminando ocho combinaciones de luz y nutrientes. Una vez elegidas las intensidades de luz de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  como los tratamientos con mayor inducción (día 3), se graficaron los valores obtenidos (Figuras 10 y 11).

En la figura 10 se observa que al día 3, se observa que la menor absorbancia se obtuvo con 75% de nitratos, y el resto de los tratamientos obtuvieron resultados similares, alrededor de 0.32 ua, sin embargo, no se detectaron diferencias entre ellos ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 5.-** Valores de absorbancia (ua, promedio  $\pm$  error estándar), a una longitud de onda de 476 nm, obtenidos de la evaluación de cuatro intensidades de luz (100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en combinación con cuatro condiciones de nutrientes, con base en el MBB 3N (0, 50, 75 y 100 % de  $\text{NaNO}_3$ ) en la inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp., para los días del 0 al 4. Las letras indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día de cultivo ( $p < 0.05$ ) ( $n = 4$ ).

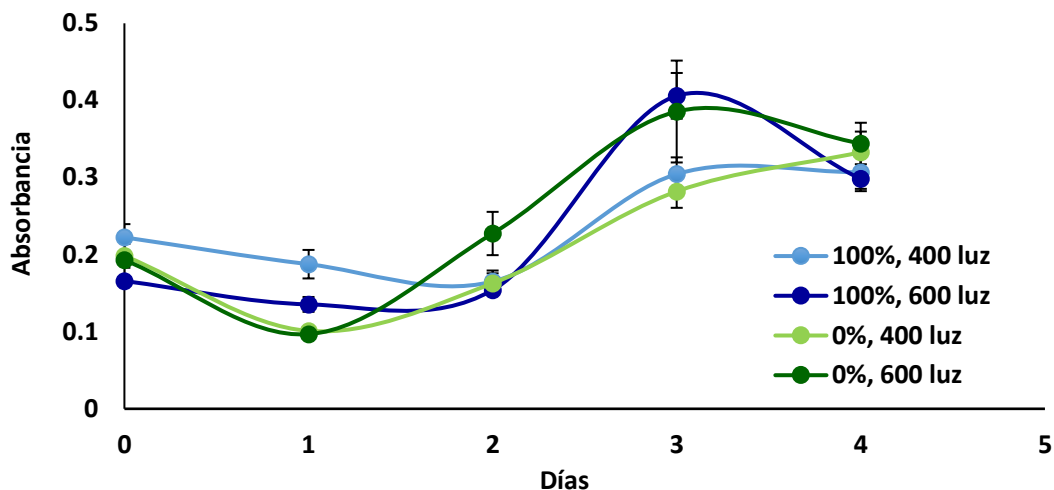
% $\text{NaNO}_3$	Día de cultivo $\rightarrow$					
	Intensidad de luz	0	1	2	3	4
0	100	0.089 <sup>bc</sup> (0.02)	0.116 <sup>fg</sup> (0.01)	0.213 <sup>a</sup> (0.03)	0.210 <sup>ab</sup> (0.01)	0.275 <sup>b</sup> (0.01)
	200	0.162 <sup>ab</sup> (0.03)	0.205 <sup>abcd</sup> (0.01)	0.186 <sup>a</sup> (0.00)	0.241 <sup>b</sup> (0.02)	0.338 <sup>b</sup> (0.02)
	400	0.198 <sup>a</sup> (0.02)	0.101 <sup>g</sup> (0.00)	0.163 <sup>a</sup> (0.01)	0.282 <sup>ab</sup> (0.02)	0.333 <sup>b</sup> (0.03)
	600	0.193 <sup>a</sup> (0.03)	0.097 <sup>g</sup> (0.00)	0.227 <sup>a</sup> (0.03)	0.386 <sup>a</sup> (0.07)	0.344 <sup>b</sup> (0.03)
50	100	0.161 <sup>ab</sup> (0.01)	0.254 <sup>a</sup> (0.01)	0.229 <sup>a</sup> (0.02)	0.329 <sup>ab</sup> (0.02)	0.324 <sup>b</sup> (0.02)
	200	0.195 <sup>a</sup> (0.03)	0.216 <sup>abc</sup> (0.02)	0.192 <sup>a</sup> (0.01)	0.302 <sup>ab</sup> (0.01)	0.389 <sup>a</sup> (0.01)
	400	0.162 <sup>ab</sup> (0.01)	0.192 <sup>bcde</sup> (0.03)	0.195 <sup>a</sup> (0.03)	0.344 <sup>ab</sup> (0.00)	0.320 <sup>b</sup> (0.02)
	600	0.164 <sup>ab</sup> (0.02)	0.139 <sup>efg</sup> (0.00)	0.180 <sup>a</sup> (0.02)	0.336 <sup>ab</sup> (0.03)	0.358 <sup>b</sup> (0.02)
75	100	0.146 <sup>ab</sup> (0.01)	0.192 <sup>bcde</sup> (0.00)	0.175 <sup>a</sup> (0.02)	0.283 <sup>ab</sup> (0.03)	0.341 <sup>b</sup> (0.01)
	200	0.145 <sup>ab</sup> (0.02)	0.179 <sup>bcde</sup> (0.01)	0.165 <sup>a</sup> (0.01)	0.276 <sup>ab</sup> (0.01)	0.331 <sup>b</sup> (0.02)
	400	0.138 <sup>ab</sup> (0.01)	0.162 <sup>cdef</sup> (0.01)	0.162 <sup>a</sup> (0.01)	0.278 <sup>ab</sup> (0.01)	0.319 <sup>b</sup> (0.02)
	600	0.163 <sup>ab</sup> (0.01)	0.148 <sup>defg</sup> (0.01)	0.156 <sup>a</sup> (0.01)	0.352 <sup>ab</sup> (0.02)	0.343 <sup>b</sup> (0.03)
100	100	0.159 <sup>ab</sup> (0.02)	0.223 <sup>ab</sup> (0.01)	0.175 <sup>a</sup> (0.01)	0.263 <sup>ab</sup> (0.05)	0.324 <sup>b</sup> (0.03)
	200	0.149 <sup>ab</sup> (0.01)	0.190 <sup>bcde</sup> (0.00)	0.162 <sup>a</sup> (0.00)	0.326 <sup>ab</sup> (0.03)	0.384 <sup>b</sup> (0.03)
	400	0.222 <sup>a</sup> (0.02)	0.188 <sup>bcde</sup> (0.02)	0.165 <sup>a</sup> (0.01)	0.304 <sup>ab</sup> (0.02)	0.307 <sup>b</sup> (0.02)
	600	0.166 <sup>ab</sup> (0.01)	0.135 <sup>defg</sup> (0.01)	0.154 <sup>a</sup> (0.01)	0.406 <sup>a</sup> (0.03)	0.298 <sup>b</sup> (0.01)



**Figura 10.-** Valores de absorbancia (ua), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. con limitación de  $\text{NaNO}_3$  en diferentes porcentajes (75 y 50 %) de  $\text{NaNO}_3$  en el medio MBB 3N, y dos intensidades de luz (400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4).

En la figura 11 se muestran los valores de absorbancia de los tratamientos con 0 y 100% de nitratos, mostrando claramente el efecto de la intensidad de luz sobre la inducción, ya que ambos tratamientos con intensidades de luz de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fueron similares, sin diferencias entre ellos en los días del experimento ( $p>0.05$ ). Estos tratamientos obtuvieron los valores máximos en el día 3, a diferencia de los tratamientos 75 y 100% de nitratos con las mismas intensidades de luz, que alcanzaron sus valores máximos en el día 4 (Figura 10).

Con los resultados obtenidos en esta evaluación, se determinó que en las siguientes pruebas de inducción se utilizaría el 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  del MBB, en combinación con otros factores de estrés para evaluar el efecto interactivo sobre la producción de pigmentos carotenoides.



**Figura 11.-** Valores de absorbancia (ua), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. con limitación de  $\text{NaNO}_3$  (100 y 0 % de  $\text{NaNO}_3$  en el medio MBB 3N), y dos intensidades de luz (400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar (n= 4).

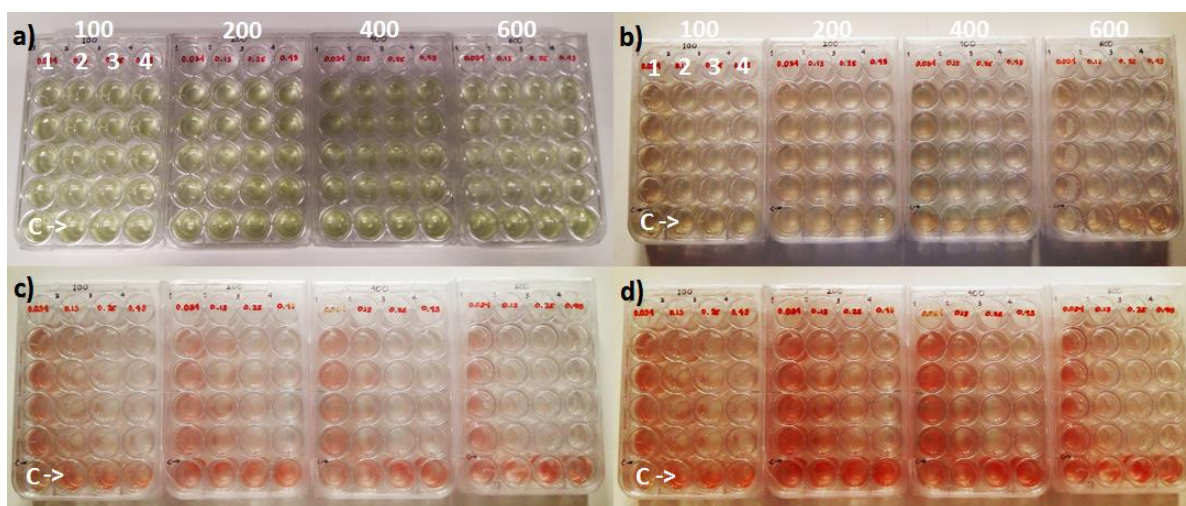
### 3.2.3. Evaluación de la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz y salinidades

En las pruebas de inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. se incluyó una evaluación con diferentes salinidades: NaCl 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M, más un control, en combinación con las cuatro intensidades de luz que ya habían sido probadas en los experimentos previos: 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En este experimento se utilizó un DCA y se empleó un ANOVA 2 vías, para evaluar el efecto de la salinidad y altas intensidades de luz, así como sus interacciones, sobre la densidad celular *Haematococcus* sp. y una prueba de Tukey, ambos con una significancia de 0.05.

La figura 12 contiene imágenes de las placas con el cultivo de *Haematococcus* sp. en los diferentes tratamientos, cada imagen pertenece a un día de la evaluación. Cada tratamiento se distribuyó por columnas de arriba hacia abajo (n=4), en la imagen se representan con un número. La última fila de pozos se utilizó para colocar los controles. El día 0 (a) muestra las cuatro placas con una tonalidad verde en el cultivo, ya que las células se encontraban en fase vegetativa. En el día 1 (b) se observa una pérdida del color verde en todos los pozos, y las salinidades de 0.13, 0.25 y 0.43 M perdieron coloración casi

totalmente, mientras que los tratamientos con la salinidad de 0.034 M y los controles se pueden observar en color amarillo pálido.

En el día 3 (c) se puede observar que la tonalidad amarilla de la salinidad 0.034 M y el control se tornó a un color rosa en todas las intensidades de luz, y los tratamientos con 0.13 y 0.25 M pueden verse en un rosa más claro, a excepción de la placa en la intensidad de luz de 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En el último día de prueba, los tratamientos con mayor inducción fueron aquellos en la salinidad de 0.034 M en todas las intensidades de luz, al igual que los controles. La salinidad de 0.43 M (4) no ocasionó la pigmentación evidente de carotenoides en el cultivo de *Haematococcus* sp. y generó altas mortalidades, por lo que se descartó para la siguiente y última evaluación (Figura 12).



**Figura 12.-** Placas de cultivo para evaluar la inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. en diferentes intensidades de luz: 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en combinación con cuatro salinidades, NaCl: 0.034 (1), 0.13 (2), 0.25 (3) y 0.43 (4) Molar, y control (C). Días 0 (a), 1 (b), 3 (c) y 4 (d). (n= 4).

La tabla 6 contiene los valores de absorbancia obtenidos a 476 nm, en una muestra de cada tratamiento durante los diferentes días de evaluación (días 0, 1, 2, y 5). En estos valores, se observa que el día 0, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos ( $p>0.05$ ) por lo que de inicio no hubo un efecto cuantificable por ninguno de los factores de estrés. Sin embargo, al día 1 si se encontraron diferencias por efecto de la salinidad, la intensidad de luz y la interacción de ambos factores ( $p<0.001$ ), siendo los tratamientos con 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en las salinidades de 0.034 y 0.43 M los que obtuvieron los valores más altos, con 0.116 y 0.132 ua respectivamente. Los valores menores se registraron en las intensidades de luz 100 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con las salinidades de 0.034, 0.13 y 0.25 M, sin diferencias

significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ), pero con los tratamientos con mayor absorbancia, sí se detectaron diferencias. En el último día de evaluación, en el tratamiento con la intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y salinidad de 0.25 M se obtuvo el mayor valor de absorbancia (0.129 ua) ( $p < 0.05$ ), sin embargo, en el control con la intensidad de  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se obtuvo un resultado aún mayor (0.187 ua). El valor de absorbancia (0.067 ua) obtenido con la salinidad de 0.25 M y  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  no fue diferente de los tratamientos con la salinidad de 0.034 M en ninguna intensidad de luz ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6).

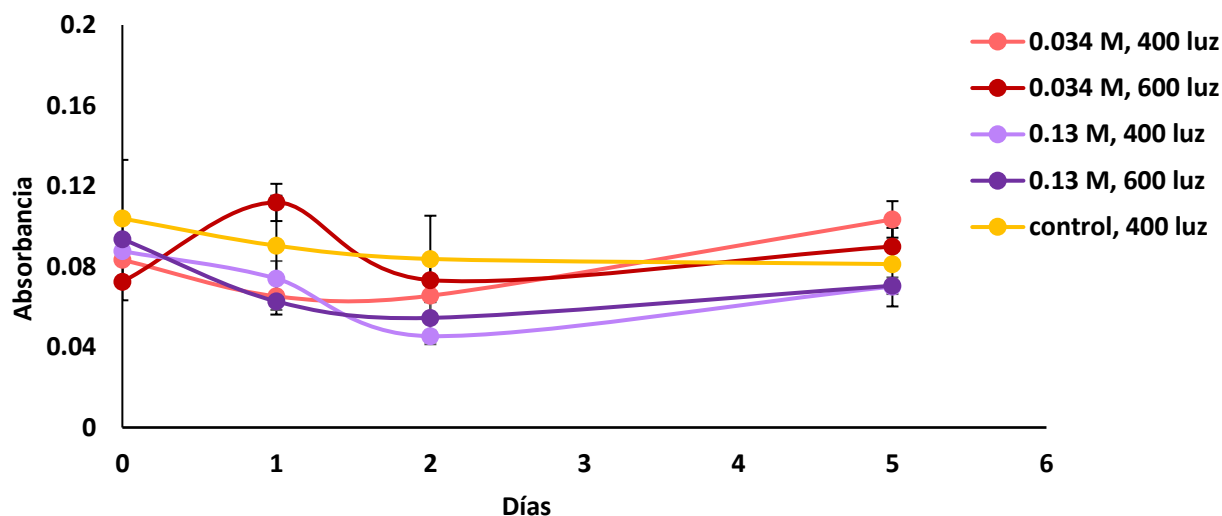
Los valores de absorbancia obtenidos al final de esta evaluación, fueron menores a los registrados con la evaluación de las diferentes concentraciones de nitratos bajo las mismas intensidades de luz, ya que al someter a *Haematococcus* sp. a diferentes salinidades, la absorbancia de astaxantina alcanzó un promedio de 0.333 ua, mientras que el promedio de absorbancia con estrés salino fue de 0.08 ua.

**Tabla 6.**- Valores de absorbancia (ua  $\pm$  error estándar), obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, de la evaluación de cuatro intensidades de luz (100, 200, 400 y  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en combinación de cuatro salinidades (NaCl: 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M) en la inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp., para los días del 0, 1, 2 y 5. Las letras indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ) ( $n = 4$ ).

Día		0		1		2		5	
NaCl (M)	Intensidad de luz	Abs.	( $\pm$ ES)	Abs.	( $\pm$ ES)	Abs.	( $\pm$ ES)	Abs.	( $\pm$ ES)
0.034	100	<b>0.076<sup>a</sup></b>	(0.03)	<b>0.062<sup>d</sup></b>	(0.00)	<b>0.063<sup>abc</sup></b>	(0.00)	<b>0.093<sup>a</sup></b>	(0.01)
	200	<b>0.085<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.057<sup>d</sup></b>	(0.00)	<b>0.082<sup>b</sup></b>	(0.00)	<b>0.118<sup>ab</sup></b>	(0.01)
	400	<b>0.083<sup>a</sup></b>	(0.02)	<b>0.065<sup>cd</sup></b>	(0.00)	<b>0.065<sup>abc</sup></b>	(0.00)	<b>0.103<sup>a</sup></b>	(0.01)
	600	<b>0.072<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.112<sup>ab</sup></b>	(0.01)	<b>0.073<sup>b</sup></b>	(0.00)	<b>0.090<sup>a</sup></b>	(0.01)
0.13	100	<b>0.072<sup>a</sup></b>	(0.02)	<b>0.075<sup>d</sup></b>	(0.01)	<b>0.048<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.073<sup>bc</sup></b>	(0.00)
	200	<b>0.090<sup>a</sup></b>	(0.02)	<b>0.054<sup>d</sup></b>	(0.00)	<b>0.059<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.077<sup>bc</sup></b>	(0.01)
	400	<b>0.088<sup>a</sup></b>	(0.02)	<b>0.074<sup>cd</sup></b>	(0.01)	<b>0.045<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.070<sup>c</sup></b>	(0.00)
	600	<b>0.094<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.063<sup>d</sup></b>	(0.00)	<b>0.054<sup>c</sup></b>	(0.01)	<b>0.070<sup>c</sup></b>	(0.00)
0.25	100	<b>0.092<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.069<sup>d</sup></b>	(0.01)	<b>0.061<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.064<sup>c</sup></b>	(0.00)
	200	<b>0.099<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.062<sup>d</sup></b>	(0.00)	<b>0.073<sup>b</sup></b>	(0.00)	<b>0.067<sup>c</sup></b>	(0.02)
	400	<b>0.100<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.097<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.066<sup>abc</sup></b>	(0.00)	<b>0.129<sup>a</sup></b>	(0.01)
	600	<b>0.115<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.086<sup>bcd</sup></b>	(0.00)	<b>0.070<sup>abc</sup></b>	(0.00)	<b>0.076<sup>bc</sup></b>	(0.01)
0.43	100	<b>0.120<sup>a</sup></b>	(0.02)	<b>0.095<sup>c</sup></b>	(0.00)	<b>0.074<sup>b</sup></b>	(0.01)	<b>0.076<sup>bc</sup></b>	(0.01)
	200	<b>0.116<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.083<sup>cd</sup></b>	(0.00)	<b>0.078<sup>b</sup></b>	(0.01)	<b>0.071<sup>bc</sup></b>	(0.01)
	400	<b>0.115<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.116<sup>ab</sup></b>	(0.01)	<b>0.078<sup>b</sup></b>	(0.01)	<b>0.078<sup>bc</sup></b>	(0.01)
	600	<b>0.106<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.132<sup>a</sup></b>	(0.01)	<b>0.089<sup>a</sup></b>	(0.00)	<b>0.082<sup>bc</sup></b>	(0.01)
Control	100	0.204	(0.02)	0.086	(0.01)	0.071	(0.00)	0.170	(0.03)
	200	0.193	(0.01)	0.112	(0.01)	0.074	(0.01)	<b>0.187</b>	(0.00)
	400	0.196	(0.02)	0.092	(0.00)	0.104	(0.02)	0.135	(0.00)
	600	0.201	(0.01)	0.092	(0.00)	0.127	(0.01)	0.139	(0.02)

Una vez seleccionadas nuevamente las intensidades de luz de 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se graficaron los resultados que se obtuvieron en combinación con todas las salinidades, con el propósito de visualizar claramente la acumulación de la astaxantina durante la evaluación (Figuras 13 y 14).

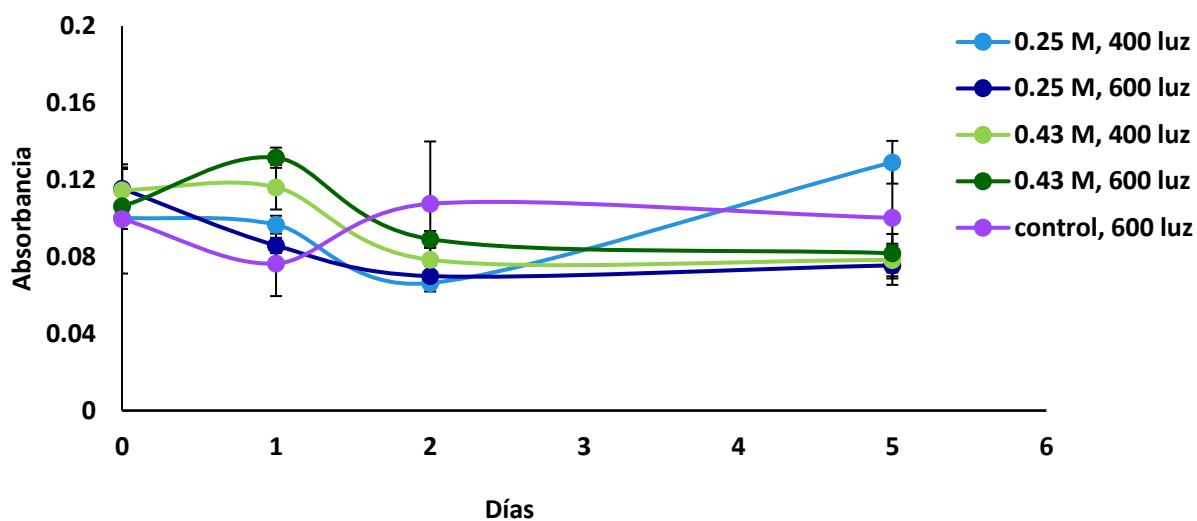
En la figura 13 se encuentran los resultados de los tratamientos con salinidades de 0.034 y 0.13 M, con las intensidades 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y los resultados del control a 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se encontraron diferencias significativas el día 1, ya que el tratamiento con 0.034 M y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  obtuvo un valor de absorbancia mayor al resto de los tres tratamientos (0.112 ua) ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas el resto de los días de cultivo ( $p > 0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13.-** Valores de absorbancia obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. con dos salinidades (0.034 y 0.13 M de NaCl), y dos intensidades de luz (400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) más un control (0 M de NaCl y 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar ( $n = 4$ ).

En la figura 14 se encuentran los resultados de los tratamientos con salinidades de 0.25 y 0.43 M, con las intensidades 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y los resultados del control a 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En el día 0 no hay diferencias estadísticas en los tratamientos con 0.043 con 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6). Al día 2, el control estuvo por arriba del resto de los tratamientos, pero al día 5 los mayores valores se obtuvieron con los tratamientos de 0.25 M con la intensidad de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y el control, que fueron significativamente diferente de los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Por lo anterior, en la última evaluación de carotenogénesis en *Haematococcus* sp. se decidió probar las salinidades de 0.034 y 0.25 M, y se incluyó el control a  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



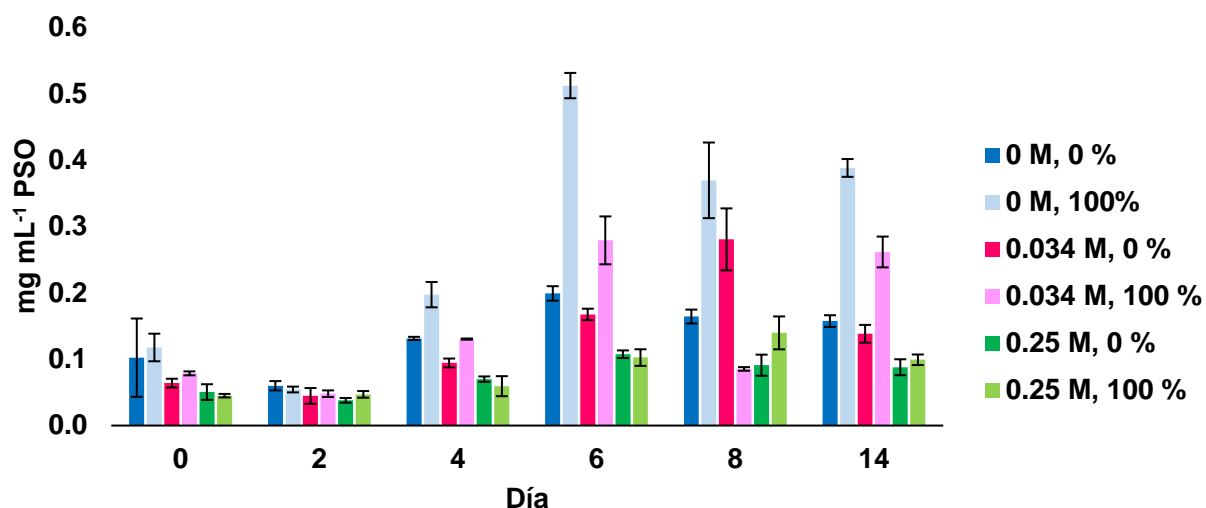
**Figura 14.-** Valores de absorbancia, obtenidos a una longitud de onda de 476 nm, en muestras de inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. con dos salinidades (0.25 y 0.43 M de NaCl), y dos intensidades de luz (400 y  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las barras representan el error estándar ( $n=4$ ).

### 3.2.4. Evaluación de la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. por salinidad, nutrientes y luz

#### a) Peso seco total (PST) y orgánico (PO) de *Haematococcus* sp.

Para la inducción a la carotenogénesis se realizó un bioensayo en el que se limitó de 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo MBB, además, se evaluaron medios con diferentes salinidades: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl. Aunado a estas dos condiciones de estrés, se sometió a los cultivos a una intensidad de luz alta, equivalente a  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La evaluación comprendió un lapso de 15 días (0-14); se registró el peso seco total (PST) y orgánico (PSO) de todos los tratamientos, los resultados obtenidos de PSO se encuentran en la figura 15.





**Figura 15.-** Peso seco orgánico (PSO, en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0% y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el MBB. Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

Debido a que solo se analizaron en HPLC las muestras de cada dos días, en la figura 15 se encuentran únicamente los resultados de PSO de los días que fueron analizados.

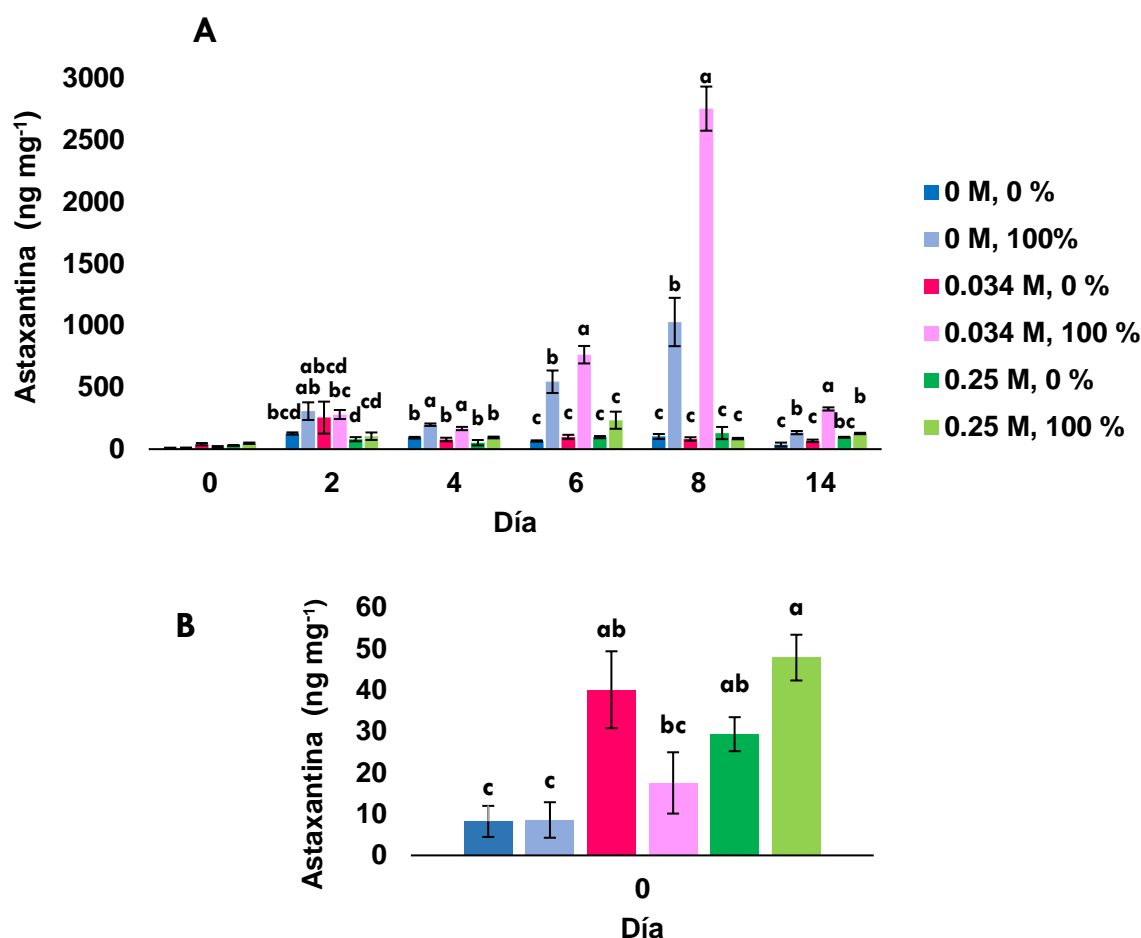
Los días en los que se registró el mayor PSO fueron: 6, 8 y 14. El tratamiento con mayor PSO para los días del 4 al 14 fue el de 0 de salinidad con 100% de nitratos (0 M, 100%), en el día 6 se registró hasta  $0.52 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Mientras que el último día de cultivo, los menores pesos se registraron con la salinidad de 0.25 M en 0 y 100% de nitratos. También se observó una particular ganancia de peso en el tratamiento 0.034 M, con 0%, ya que en el día 2 obtuvo  $0.045 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y en el octavo día tuvo un aumento de 5 veces el PSO con  $0.28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 15).

### b) Análisis de pigmentos

El contenido de los pigmentos identificados en cada uno de los tratamientos se muestra de manera individual en las gráficas de barras indicadas en las figuras 16 a 20. En este último experimento se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis por cada pigmento y por cada factor de estrés, ya que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad aún después de haber sido transformados. Se utilizó un nivel de significancia de  $p<0.05$ . Finalmente, debido a la naturaleza de los datos y el análisis estadístico empleado no se pudo evaluar el efecto interactivo de los factores de estrés sobre la producción de pigmentos.

La figura 16 muestra los resultados del contenido de astaxantina (3S, 3'S-astaxantina) ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) para cada uno de los tratamientos evaluados. Se incluyen dos gráficas de barras, la gráfica B contiene los resultados de astaxantina obtenidos en el día 0. El tratamiento con mayor concentración de astaxantina al día 0, fue 0.25 M, 100% nitratos ( $47.8 \pm 5.5 \text{ ng mg}^{-1}$ ), sin diferencias entre los tratamientos a los que se les añadió sal ( $p > 0.05$ ). Los tratamientos con 0M con 0 y 100%, obtuvieron contenidos de astaxantina similares ( $8.21$  y  $8.56 \text{ ng mg}^{-1}$ ).

En la gráfica A (Figura 16) se encuentran los resultados a partir del día 2. Se observa que hubo una tendencia de incremento en astaxantina en los tratamientos con 0 y 0.034 M, con 100% de  $\text{NaNO}_3$ , ya que estos tratamientos obtuvieron el mayor contenido de astaxantina en los días 6 y 8 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 16.-** Contenido de astaxantina ( $\text{ng mg}^{-1}$ , con base en el peso seco total), de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de  $\text{NaCl}$ , cada uno con 0% y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. A): Resultados obtenidos en los días 2, 4, 6, 8 y 14; B) Resultados obtenidos en el día 0. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

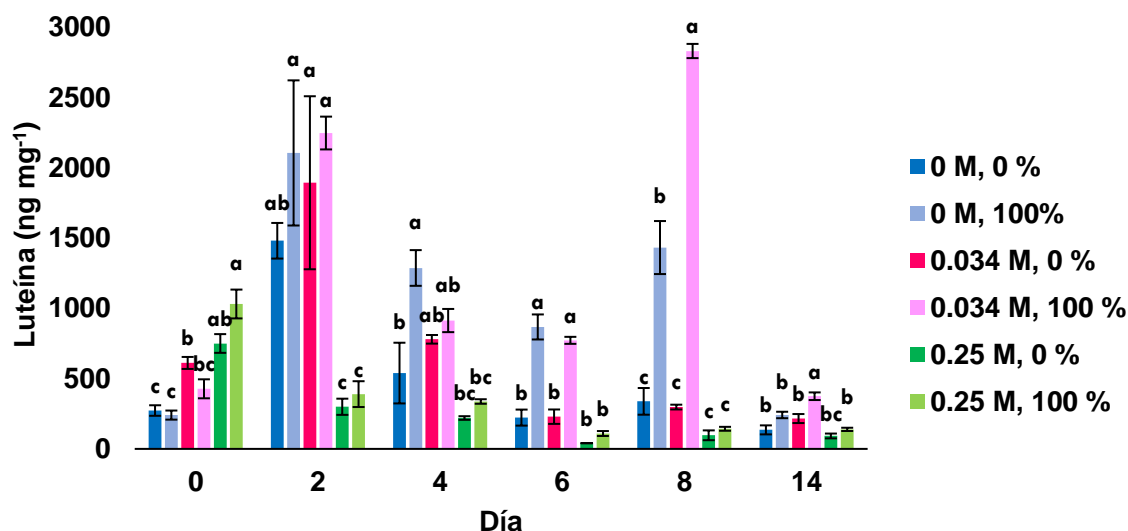


**Tabla 8.-** Contenido de astaxantina (%), en *Haematococcus* sp. en condiciones de estrés, durante los días de cultivo, en diferentes tratamientos: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, con 0 y 100% de NaNO<sub>3</sub> en el medio Basal Bold (n=3).

Astaxantina (%)	Tiempo (Días)	0		2		4		6		8		14	
	% NaNO <sub>3</sub>	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
	Salinidad (M)												
	0	0.01	0.01	0.13	0.31	0.09	0.20	0.07	0.54	0.10	<b>1.03</b>	0.04	0.13
	<b>0.034</b>	0.04	0.02	0.25	0.28	0.08	0.17	0.10	0.76	0.08	<b>2.75</b>	0.07	0.32
	<b>0.25</b>	0.03	0.05	0.08	0.10	0.05	0.09	0.10	0.23	0.13	0.09	0.10	0.13

Los resultados del contenido de luteína ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) de cada tratamiento se encuentran en la figura 17. Los mayores contenidos se obtuvieron en los días 2 y 8 de la evaluación. El mayor contenido de luteína se obtuvo el día 8 de cultivo, con el tratamiento 0.034 M y 100% de nitratos ( $2833 \pm 51 \text{ ng mg}^{-1}$ ). En el día 2 los tratamientos con 0 y 0.034 M en combinación de 0 y 100% de NaNO<sub>3</sub> obtuvieron resultados similares, con una concentración máxima de  $2249 \text{ ng mg}^{-1}$  (0.034 M, 100%). El mismo día los tratamientos con la salinidad de 0.025 M con 0 y 100% de nitratos obtuvieron bajos contenidos de luteína ( $300$  y  $390 \text{ ng mg}^{-1}$ ) ( $p < 0.01$ ), y las bajas concentraciones continuaron hasta el día 14. De acuerdo con el ANOVA, la salinidad de 0.25 M tuvo un efecto en la disminución de los contenidos de luteína.

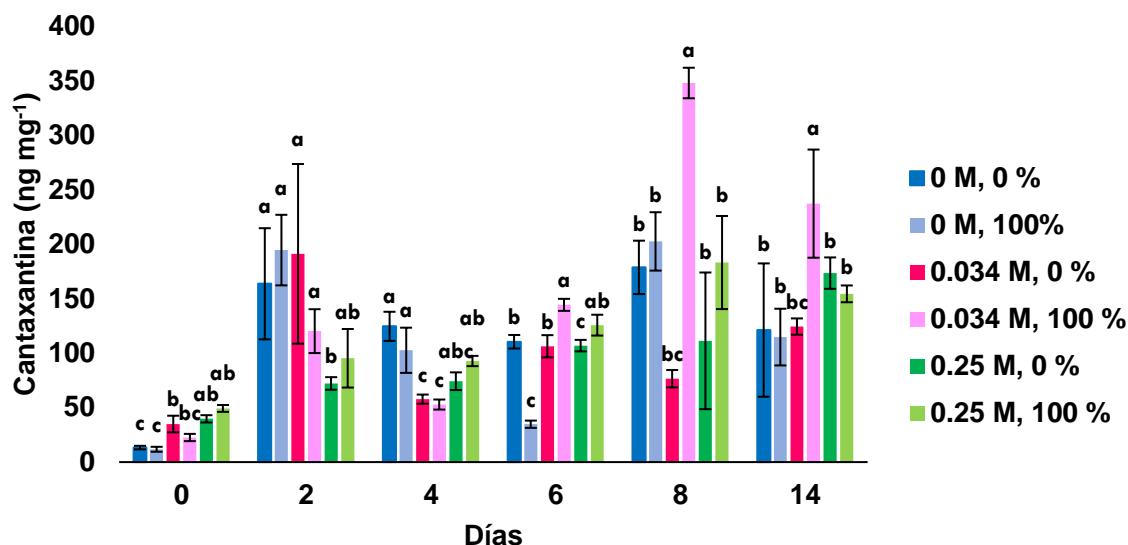
Al igual que los valores de astaxantina descritos anteriormente, los resultados de luteína observados presentaron una disminución considerable al día 14 de la evaluación (Figura 17).



**Figura 17.-** Contenido de luteína ( $\text{ng mg}^{-1}$ , con base en el peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

El contenido de cantaxantina ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) obtenido durante la evaluación se resume en la figura 18, con los resultados obtenidos para cada tratamiento. Los mayores contenidos de cantaxantina se encontraron en los días 8 y 14 del experimento con el tratamiento 0.034 M con 100% de nitratos, alcanzando los  $348 \pm 14 \text{ ng mg}^{-1}$  en el día 8, y  $237 \pm 49 \text{ ng mg}^{-1}$  en el día 14 ( $p < 0.001$ ).

Los menores contenidos de cantaxantina durante la evaluación se registraron en el día 0, y en este día, los mayores resultados de este pigmento se obtuvieron en los tratamientos con la salinidad de 0.25 con 0 y 100% de nitratos, con  $39.7 \pm 3 \text{ ng mg}^{-1}$  y  $49.2 \pm 3 \text{ ng mg}^{-1}$  respectivamente. Los tratamientos con bajos contenidos de cantaxantina en el día 0 de la evaluación, con concentraciones de 13 y  $12 \text{ ng mg}^{-1}$  incrementan su concentración en unas 10 veces su valor inicial al segundo día ( $163.64 \pm 51 \text{ ng mg}^{-1}$  y  $194.53 \pm 32 \text{ ng mg}^{-1}$ ) (Figura 18).



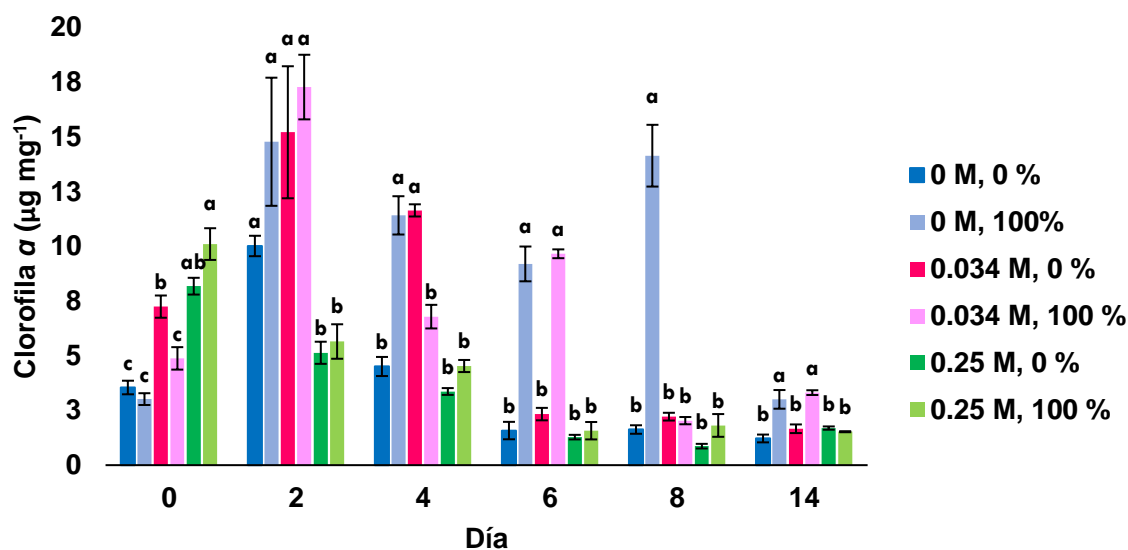
**Figura 18.-** Contenido de cantaxantina ( $\text{ng mg}^{-1}$  con base en el peso seco) en *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14 de cultivo. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

Los resultados obtenidos de clorofila *a* se encuentran graficados en la figura 19. En general, en aquellos tratamientos en los que predominó el pigmento astaxantina (0.034 M, 100%), se presentó la clorofila *a* en más bajas concentraciones que el resto ( $2.0 \mu\text{g mg}^{-1}$ ).

En la figura 19 se puede observar que los días 0 y 2 obtuvieron los resultados más altos en el contenido de este pigmento ( $p < 0.05$ ) con los tratamientos 0 M y 0.034 M, con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$ . El mayor contenido de clorofila *a* fue de  $17.3 \mu\text{g mg}^{-1}$  (0.034 M, 100%), seguido de  $15.2 \mu\text{g mg}^{-1}$  (0.034 M, 0%) y  $14.8 \mu\text{g mg}^{-1}$  (0 M, 100%), todos obtenidos en el día 2 de evaluación sin diferencias entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Con excepción del día 0, el tratamiento con 0 M, 0% mantuvo altos contenidos de clorofila *a* con respecto al resto de los tratamientos, en el día 8 el contenido de clorofila fue significativamente mayor al resto de los tratamientos con  $14.1 \mu\text{g mg}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ), mientras que el resto de los tratamientos obtuvieron resultados similares entre ellos con concentraciones alrededor de  $2.5 \mu\text{g mg}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) (Figura 19).

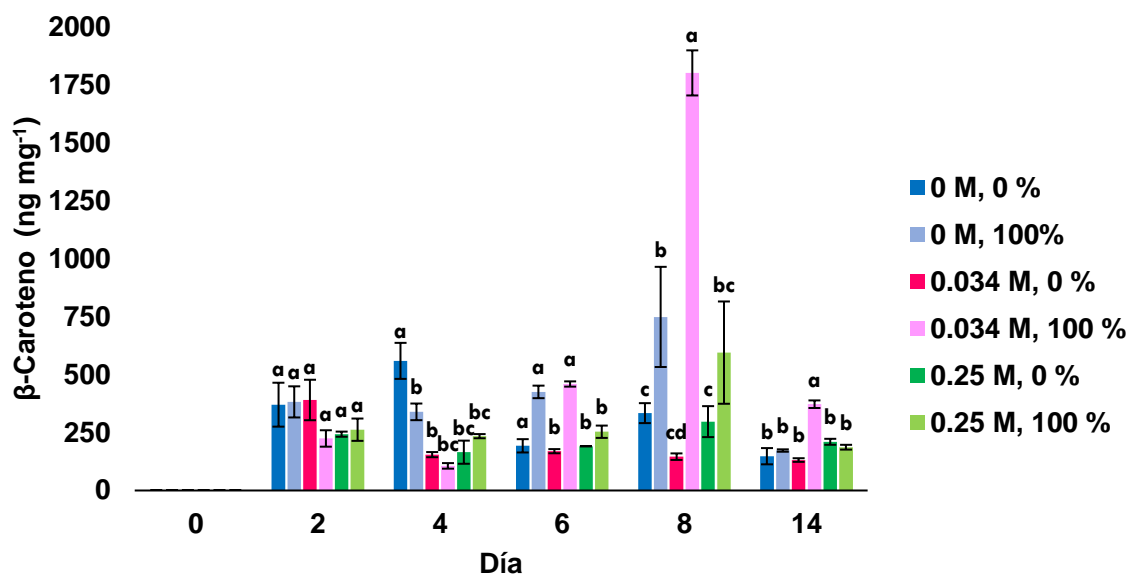
La clorofila *a* obtuvo los contenidos de pigmentos más altos, ya que las concentraciones obtenidas son dos órdenes de magnitud mayores que el resto de los pigmentos.



**Figura 19.-** Contenido de clorofila  $a$  ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  con base en el peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14 de cultivo. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

Los resultados del  $\beta$ -caroteno se encuentran en la figura 20. No se obtuvo  $\beta$ -caroteno en el día 0, sino hasta el día 2, con resultados similares en todos los tratamientos, que obtuvieron una concentración máxima de  $390 \text{ ng mg}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). Los días 6 y 8 obtuvieron los mayores contenidos de este pigmento, sobresaliendo dos tratamientos del resto (0 M, 100% y 0.034 M, 100%), con concentraciones similares en el día 6, con  $425 \pm 27 \text{ ng mg}^{-1}$  y  $460 \pm 11 \text{ ng mg}^{-1}$ , respectivamente ( $p > 0.05$ ). Mientras que para el día 8 el tratamiento de 0.034 M, 100 % fue significativamente mayor que la combinación de 0 M, 100 %, con un resultado de  $1804 \pm 97 \text{ ng mg}^{-1}$ , sobre  $750 \pm 216 \text{ ng mg}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ) (Figura 20).

Al día 14 del experimento, se obtuvieron bajas concentraciones de  $\beta$ -Caroteno en las muestras de *Haematococcus* sp., con solo un tratamiento diferente del resto (0.034 M, 100%), que obtuvo  $372 \pm 16 \text{ ng mg}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).

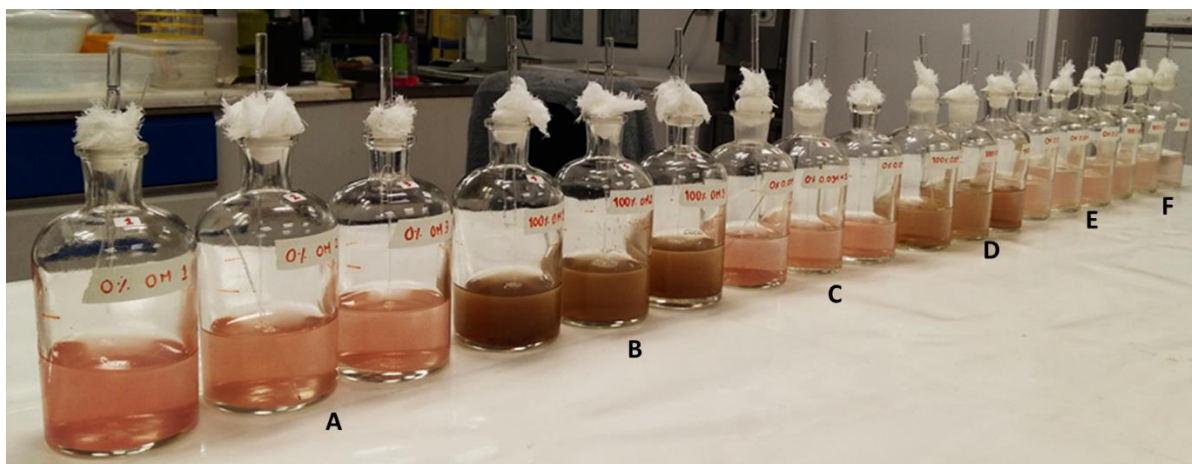


**Figura 20.-** Contenido de  $\beta$ -caroteno (ng mg<sup>-1</sup> con base en el peso seco) de *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo: 0, 0.034 y 0.25 M de NaCl, cada uno con 0 y 100% de NaNO<sub>3</sub> en el medio Basal Bold. Resultados para los días 0, 2, 4, 6, 8 y 14. Las letras asignadas indican las diferencias entre los tratamientos en el mismo día ( $p < 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar ( $n=3$ ).

Para presentar todos los resultados del contenido de pigmentos en mg g<sup>-1</sup> a lo largo de los días de evaluación, se transformaron y resumieron los valores en la tabla 9. En esta tabla se muestran los valores de cada pigmento ( $\pm$  Error estándar), para facilitar la visualización de los contenidos de pigmentos más relevantes y para su comparación con otros autores. Lo que se puede observar más a detalle en esta tabla, es que los mejores resultados para el contenido de astaxantina se obtuvieron con el tratamiento de salinidad 0.034 M, con 100% de NaNO<sub>3</sub>. Además, este tratamiento favoreció la presencia de otros pigmentos carotenoides como la cantaxantina y el  $\beta$ -caroteno. Al mismo tiempo, ocasionó que las células de *Haematococcus* sp. detuvieran la producción de clorofila *a* y comenzaran con el proceso de carotenogénesis (Tabla 9).

En la figura 21 se muestran los cultivos de *Haematococcus* sp. (Día 14) a los que se les realizó el análisis del contenido de pigmentos. Se pueden observar las diferentes coloraciones de las células, color marrón en los cultivos con 100% de NaNO<sub>3</sub>, y color rojizo con limitación de nitratos. Además, la coloración es más intensa en los tratamientos A y C (0 y 0.034 M respectivamente), ya que con la salinidad de 25 M los cultivos tenían una apariencia ligeramente lechosa.





**Figura 21.-** Cultivos de *Haematococcus* sp. bajo condiciones de estrés salino y limitación de nutrientes en el día 14 de evaluación. Los tratamientos se muestran de izquierda a derecha comenzando por 0 M NaCl, 0% NaNO<sub>3</sub> (A); 0 M, 100% (B); 0.034 M, 0% (C); 0.034 M, 100% (D); 0.25 M, 0% (E) y 0.25 M, 100% (F).

**Tabla 9.-** Contenido promedio de pigmentos en  $\text{mg g}^{-1}$  ( $\pm$  Error estándar) obtenidos en cultivo de *Haematococcus* sp. bajo diferentes condiciones de cultivo: estrés salino (0, 0.034 y 0.25 M de NaCl), y por limitación de  $\text{NaNO}_3$  con base en el MBB (n=3).

Pigmento ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Salinidad (M)	0		2		4		6		8		14	
		Tiempo (Días)	% $\text{NaNO}_3$		% $\text{NaNO}_3$		% $\text{NaNO}_3$		% $\text{NaNO}_3$		% $\text{NaNO}_3$		% $\text{NaNO}_3$	
			0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
Astaxantina	0	0.08 (0.0)	0.09 (0.0)	1.26 (0.0)	3.07 (0.1)	0.92 (0.0)	1.98 (0.0)	0.66 (0.0)	5.45 (0.2)	1.02 (0.0)	10.28 (0.1)	0.37 (0.0)	1.34 (0.0)	
	0.034	0.40 (0.0)	0.18 (0.0)	2.55 (0.1)	2.80 (0.0)	0.78 (0.0)	1.67 (0.0)	0.99 (0.0)	7.64 (0.1)	0.82 (0.0)	27.53 (0.1)	0.67 (0.0)	3.25 (0.0)	
	0.25	0.29 (0.0)	0.48 (0.0)	0.80 (0.0)	1.04 (0.0)	0.52 (0.0)	0.94 (0.0)	0.97 (0.0)	2.34 (0.1)	1.30 (0.0)	0.86 (0.0)	0.96 (0.0)	1.27 (0.0)	
Luteína	0	2.73 (0.0)	2.41 (0.0)	14.82 (0.1)	21.07 (0.5)	5.40 (0.2)	12.88 (0.1)	2.23 (0.1)	8.68 (0.1)	3.38 (0.1)	14.33 (0.1)	1.35 (0.0)	2.41 (0.0)	
	0.034	6.12 (0.1)	4.28 (0.1)	18.95 (0.6)	22.49 (0.1)	7.80 (0.0)	9.14 (0.1)	2.29 (0.1)	7.73 (0.0)	2.98 (0.0)	28.33 (0.0)	2.16 (0.0)	3.75 (0.0)	
	0.25	7.50 (0.1)	10.32 (0.2)	3.00 (0.1)	3.90 (0.1)	2.20 (0.0)	3.37 (0.0)	0.41 (0.0)	1.09 (0.0)	0.97 (0.0)	1.43 (0.0)	0.92 (0.0)	1.39 (0.0)	
Cantaxantina	0	0.13 (0.0)	0.12 (0.0)	1.64 (0.1)	1.95 (0.0)	1.25 (0.0)	1.03 (0.0)	1.10 (0.0)	0.35 (0.0)	1.79 (0.0)	2.03 (0.0)	1.21 (0.1)	1.15 (0.0)	
	0.034	0.35 (0.0)	0.23 (0.0)	1.91 (0.1)	1.20 (0.0)	0.58 (0.0)	0.53 (0.0)	1.06 (0.0)	1.44 (0.0)	0.77 (0.0)	3.48 (0.0)	1.24 (0.0)	2.37 (0.0)	
	0.25	0.40 (0.0)	0.49 (0.0)	0.72 (0.0)	0.95 (0.0)	0.74 (0.0)	0.93 (0.0)	1.07 (0.0)	1.26 (0.0)	1.11 (0.0)	1.83 (0.1)	1.73 (0.0)	1.54 (0.0)	
Clorofila $\alpha$	0	35.48 (0.3)	30.18 (0.3)	100.16 (0.5)	147.80 (2.9)	45.08 (0.4)	114.16 (0.9)	15.80 (0.4)	91.96 (0.8)	16.28 (0.2)	141.43 (1.0)	12.20 (0.2)	30.06 (0.4)	
	0.034	72.45 (0.5)	48.80 (0.5)	152.14 (3.0)	172.79 (1.5)	116.43 (0.3)	67.87 (0.5)	23.33 (0.3)	96.59 (0.2)	22.16 (0.3)	20.34 (0.1)	16.63 (0.2)	33.14 (0.1)	
	0.25	81.79 (0.4)	101.04 (0.7)	51.36 (0.5)	56.60 (0.8)	33.66 (0.2)	45.31 (0.3)	12.81 (0.0)	15.73 (0.4)	8.68 (0.1)	18.15 (0.7)	16.95 (0.1)	15.28 (0.0)	
$\beta$ -Caroteno	0			3.71 (0.1)	3.38 (0.1)	5.60 (0.1)	3.40 (0.0)	1.93 (0.0)	4.26 (0.0)	3.34 (0.0)	7.50 (0.2)	1.48 (0.0)	1.73 (0.0)	
	0.034			3.91 (0.0)	2.25 (0.0)	1.55 (0.0)	1.06 (0.0)	1.70 (0.0)	4.60 (0.0)	1.46 (0.0)	18.04 (0.0)	1.32 (0.0)	3.73 (0.0)	
	0.25			2.43 (0.0)	2.63 (0.0)	1.65 (0.0)	2.35 (0.0)	1.91 (0.0)	2.54 (0.0)	2.98 (0.0)	5.96 (0.3)	2.10 (0.0)	1.87 (0.0)	

## Capítulo 4. Discusión

---

El género *Haematococcus* es uno de los más importantes dentro de la biotecnología de las microalgas, debido a su capacidad para acumular el carotenoide astaxantina, que puede obtenerse a escala comercial a través de su cultivo masivo. Sin embargo, esta microalga tiene bajas tasas de crecimiento y bajas densidades celulares al cultivarse con medios tradicionales, características que limitan su producción (Fábregas *et al.*, 1998; Lorenz y Cysewski, 2000).

Actualmente se estudian diversas cepas de *Haematococcus* que han sido aisladas de diversas partes del mundo, cada una de las cepas posee características fisiológicas diferentes, lo que sugiere también diferencias a nivel genético, ambas diferenciaciones indican sustancial diversidad en *Haematococcus*. Los múltiples estudios que se realizan al respecto pretenden la caracterización y la estandarización del cultivo, ya que esto permitiría la selección de especies o cepas con rápido crecimiento, resistencia a bajas o altas temperaturas, así como facilidad de adaptación al medio, significando reducción de costos para las plantas productoras de biomasa y sobre todo, altas tasas de producción de astaxantina (Allewaert *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2016). Bajo este contexto, es importante mencionar que la microalga *Haematococcus* empleada en este estudio fue aislada localmente, y todos los resultados obtenidos serán útiles para futuros estudios en su caracterización y finalmente su producción masiva.

Para optimizar el cultivo de una nueva cepa de microalgas, se deben estudiar las variables ambientales y los requerimientos generales de la especie, ya que afectan directamente la fisiología de la célula, influyendo en su crecimiento, composición bioquímica y en el rendimiento final. Estos requerimientos pueden ser especie-específicos dependiendo de su lugar de origen.

Con respecto a los estudios enfocados en la producción de biomasa de *Haematococcus*, destacan en la literatura el uso de diferentes medios de cultivo, en los que varían principalmente las fuentes de nitrógeno, la irradianza y la temperatura (Tripathi *et al.*, 1999; Fábregas *et al.*, 2000; Sarada *et al.*, 2002; Orosa *et al.*, 2001 y 2005).

Las condiciones de cultivo establecidas en el primer bioensayo de crecimiento permitieron evaluar tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y cuatro intensidades de luz (30, 40, 50 y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) utilizando el medio selectivo MBB, variables que fueron seleccionadas de acuerdo a diversos artículos, en los que se reporta

el crecimiento de *Haematococcus* a temperaturas de entre 18 y 25°C, e intensidades de luz entre los 35 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Boussiba y Bing, 1999; Fábregas *et al.*, 2000; Cifuentes *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2014). Como resultado de este experimento, se seleccionó la temperatura de 21°C y la intensidad de luz de 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  como las condiciones que favorecieron el crecimiento de *Haematococcus* sp., con las que se alcanzó una densidad máxima de  $320\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>. Estos resultados son menores a los obtenidos por Fábregas *et al.* (1998), quienes obtuvieron biomásas de  $450\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup> en una temperatura superior (25°C), sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo son superiores a los obtenidos en *H. pluvialis* por Fábregas *et al.* (2000) y por Göksan *et al.* (2011), quienes reportan densidades de solo  $150\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup> bajo 40 y 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y 25°C, en ambos casos se utilizó el medio MBB.

Estas diferencias obtenidas en la densidad celular, bajo las condiciones de cultivo que han sido evaluadas previamente en otras cepas de *Haematococcus*, pueden ser el resultado de la diversidad, adaptación fisiológica de la célula y de su genética.

Como ya se mencionó, el crecimiento de la microalga *Haematococcus* en la fase vegetativa es una de las partes más importantes en el proceso de producción, por ello se han estudiado diversos medios de cultivo que produzcan altas densidades. En el estudio de Cifuentes *et al.* (2003), se evaluaron las condiciones óptimas de crecimiento para *H. pluvialis* comparando diferentes medios de cultivo, con NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y urea como fuentes de nitrógeno y encontraron las mayores densidades ( $250\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>) en el medio que contenía NH<sub>4</sub>Cl. Los cultivos con NaNO<sub>3</sub> obtuvieron densidades máximas de  $170\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup> (con 35  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en una temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Estas condiciones son similares a las establecidas en el segundo bioensayo de crecimiento de este trabajo, dónde se realizaron cultivos con el medio MBB 3N (con NaNO<sub>3</sub>) y el fertilizante agrícola Plantafol (PL), que contiene 10% de Nitrógeno (N): 8% N amoniacal y 2% N ureico.

En este bioensayo se obtuvieron densidades mayores con el medio PL ( $207\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>) que con el medio control MBB ( $132.6 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>). Estas respuestas indican que *Haematococcus* sp. asimila de manera más efectiva las fuentes de nitrógeno amoniacal como estrategia de consumo energético, ya que el nitrato de sodio representa un gasto energético mayor en la célula (Richmond y Hu, 2013). Sin embargo, Orosa *et al.* (2005) mencionan que al cultivar *H. pluvialis* bajo una concentración de  $0.15 \text{ g L}^{-1}$  de NaNO<sub>3</sub> se pueden alcanzar densidades celulares de hasta  $1200\times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>.

Existen varios estudios de otras especies de microalgas como *Isochrysis galbana* (T-ISO) (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999), *Rhodomonas* sp. (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005), *Porphyridium cruentum*

(González-Muñoz, 2006) que reportan buen crecimiento celular al utilizar fertilizantes agrícolas en el medio de cultivo, con la ventaja de ser un medio de menor costo. Escuredo-Vielva (2014) evaluó el crecimiento de *Haematococcus* sp., utilizando como medio de cultivo cuatro fertilizantes agrícolas, entre ellos Plantafol y el medio control MBB, alcanzando las densidades más altas con el medio Plantafol ( $320 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>), muy por arriba del control MBB ( $200 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>). Este autor también evaluó tres intensidades de luz (60, 85 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y consiguió los mejores resultados de crecimiento con una irradianza de 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , obteniendo hasta  $718 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>. Con la información de este autor se pudieron acotar las primeras condiciones de cultivo para evaluar el crecimiento de la especie de *Haematococcus* sp. de este estudio y se comprobó que el medio PL también favorece la reproducción de esta cepa, con densidades mayores a las que se pueden obtener con el MBB. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo concentraciones de  $210 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>, bajo las mismas condiciones de luz y temperatura establecidas por Escuredo-Vielva (2014).

Tomando en consideración que el efecto de la limitación de nutrientes, la interacción con salinidades y/o una intensidad de luz alta, son factores favorables para la producción de pigmentos carotenoides (Borowitzka *et al.*, 1990), los experimentos realizados en este estudio, para la inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus*, se planearon de acuerdo a las variables de estrés con las que se reportaron altos contenidos de astaxantina, establecidas por algunos autores, como salinidades, privación de nutrientes y altas intensidades de luz. Una vez seleccionadas las intensidades de luz que produjeron la mayor acumulación de carotenoides, se decidió evaluar otros factores de estrés y probar si el efecto de una combinación de variables podría incrementar la producción del carotenoide astaxantina.

Se han realizado estudios para inducir la carotenogénesis en *Haematococcus*, en los que no solo se limita el contenido de nitrógeno, sino que además se le puede privar de fosfatos, metales traza, vitaminas e incluso someterle a un medio sin nutrientes (Boussiba y Vonshak, 1991; Fábregas *et al.*, 1998; Brinda *et al.*, 2004; Imamoglu *et al.*, 2009; Göksan *et al.*, 2011). La limitación de nutrientes que se probó en este estudio fue únicamente eliminando cierto porcentaje de NaNO<sub>3</sub> del contenido total en el medio MBB. Los valores más altos de absorbancia (a 476 nm) fueron en los tratamientos con mayor grado de inducción. Se observó una diferencia notable en la pigmentación de las células del día 0 al día 4 de la evaluación, como evidencia de la inducción a la producción de pigmentos, además, los valores de absorbancia obtenidos en el día 0 incrementaron en un 100% al día cuatro, por lo que la inducción resultó efectiva. Las intensidades de luz que produjeron mayor grado de inducción fueron 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en el tercer día de cultivo. Estas intensidades de luz resultan efectivas para la inducción a la carotenogénesis de acuerdo con los resultados de otros autores, Calero-Estévez (1998), menciona que la intensidad de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

incrementó la concentración de carotenoides totales, Imamoglu *et al.* (2009) mencionan haber obtenido las concentraciones de astaxantina más altas al privar de nitrógeno el cultivo y utilizar una intensidad de luz de  $546 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Estas evaluaciones se hicieron en periodos menores a 8 días, sin embargo, otros autores mencionan que, intensidades de luz entre 85 y  $230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , son suficientes para favorecer la producción de carotenoides en *Haematococcus* en periodos prolongados, de 8 hasta 18 días (Fábregas *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 2003; Göksan y Ak, 2006).

El estrés salino causa a su vez diferentes respuestas en las células, como el estrés iónico, osmótico y oxidativo (Affenzeller *et al.*, 2009). Estos tipos de estrés inducen en las células la producción y acumulación de compuestos que contrarresten los daños, por ejemplo *Dunaliella tertiolecta* acumula gran cantidad de lípidos y glicerol, así como enzimas antioxidativas (Takagi *et al.*, 2006), y en especies de agua dulce como *Chlorella zofingiensis* y *Haematococcus pluvialis* provoca la acumulación de pigmentos carotenoides, lo que hace a la salinidad un tema de investigación en *Haematococcus* por un buen número de autores (Boussiba y Vonshak, 1991; Cordero *et al.*, 1996; Sarada *et al.*, 2002; Cifuentes *et al.*, 2003).

En este estudio se utilizaron cuatro salinidades (0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M de NaCl), que fueron elegidas con base en los contenidos finales de astaxantina obtenidos por Cordero *et al.* (1996) y por Tam *et al.* (2012). En el primer estudio mencionado, se reportó un máximo contenido de astaxantina del 3.15% (con base en el peso seco orgánico, PSO), al utilizar 0.2% de NaCl (equivalente a 0.034 M), y los menores porcentajes (0.13 %) con 0.4% de NaCl (0.068 M), mientras que Tam *et al.* (2012) mencionan que se emplearon las salinidades de 0.13, 0.25 y 0.43 M de NaCl, con lo que se incrementaron los contenidos de astaxantina con valores por arriba de los obtenidos solo con la limitación de nutrientes en el medio, además, cesó el crecimiento. En este estudio se consideró no rebasar salinidades de 1%, ya que Borowitzka *et al.* (1990) y Sarada *et al.* (2002) reportan que *Haematococcus pluvialis* no puede crecer bajo estas condiciones.

De acuerdo con las observaciones realizadas en el experimento con diferentes salinidades, los mejores resultados en producción de astaxantina se obtuvieron con 0.034 y 0.25 M de NaCl, ya que las células siguieron dividiéndose y al mismo tiempo hubo acumulación de los pigmentos carotenoides. Esto se comprobó con los registros diarios de los valores de absorbancia.

Es importante mencionar que los valores de absorbancia, obtenidos en la evaluación con limitación de nitratos, fueron mayores a las absorbancias que se obtuvieron en las pruebas de inducción con diferentes salinidades. Cifuentes *et al.* (2003), indican que las condiciones de estrés con NaCl causaron el incremento

de los pigmentos carotenoides en *H. pluvialis*, y que, a mayor concentración de sal, el contenido de astaxantina aumentó, sin embargo, no permitió la reproducción de la célula, por el contrario, las concentraciones mayores causaron altas mortalidades, mientras que la limitación de nutrientes no fue impedimento para continuar con la división celular. Como consecuencia de las altas mortalidades, si se obtiene producción de astaxantina (W/V), sin embargo, resulta en un menor rendimiento de astaxantina por volumen de cultivo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Cifuentes *et al.*, 2003).

En el presente estudio, en el experimento final se obtuvo el contenido promedio de seis pigmentos: astaxantina, luteína, cantaxantina, clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno (Anexo I). Antes de poder cuantificar los pigmentos tuvieron que ser extraídos de las células, y una vez extraídos fue posible calcular el contenido por cada muestra. Estos pigmentos fueron detectados en ese orden por una columna  $\text{C}_8$ , fueron separados exitosamente en un lapso de 25 minutos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y se confirmaron por medio de sus tiempos de retención obtenido de los estándares de referencia (ANEXO I). El contenido de estos pigmentos se cuantificó durante 15 días de evaluación, con respecto al PSO de la muestra.

El método de extracción es proceso delicado en el que se deben extremar los cuidados, ya que se corre el riesgo de que sean degradados u oxidados, a causa de altas temperaturas o exposición a la luz. Existe un gran número de métodos de extracción de pigmentos, que en general se enfocan en la determinación de la clorofila  $\alpha$ , utilizando solventes orgánicos cuya eficiencia dependerá de la composición de la microalga. Es decir, el potencial de extracción de un solvente dependerá de la hidratación y permeabilidad de la pared celular de la microalga (Henriques *et al.*, 2007). En el caso de *Haematococcus* sp. la pared celular de las microalgas que se enquistan (aplanosporas) está constituida principalmente de un polisacárido natural llamado esporopolenina, conocido por su resistencia a sustancias corrosivas como ácidos, sustancias altamente básicas con pH de hasta 13, resistente a altas temperaturas e incluso a alta presión (Mendes-Pinto *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2015). Por lo que las técnicas de extracción para este tipo de componentes celulares, generalmente deben utilizar métodos químicos, enzimáticos o mecánicos (Henriques *et al.*, 2007). Este tipo de extracciones evalúan su efectividad en términos de astaxantina recuperada, ya que es el pigmento de mayor interés en el cultivo de esta especie, por lo que el resto de los pigmentos como las clorofilas son destruidos con pretratamientos de NaOH y KOH (saponificación) (Boussiba *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2013).

La técnica de extracción empleada en este trabajo es poco común, sin embargo, hay información disponible del uso de un método similar para la extracción de astaxantina en *H. pluvialis*. Bubrick (1991) describe un método de extracción en el que los quistes se mezclan en nitrógeno líquido, se adiciona BHT como antioxidante y se agita, de esta manera se resuelve la posible oxidación de los pigmentos extraídos y quedan disponibles para ser deshidratados.

La elección del método de análisis de pigmentos por medio de cromatografía líquida (HPLC), es igual de importante que el proceso de extracción, debido a la complejidad de la composición de los pigmentos en la muestra, dicho método puede o no facilitar su separación, haciendo más efectiva su identificación, sobre todo en los ésteres de astaxantina y clorofilas que son comúnmente encontrados en las muestras de *Haematococcus* (Yuan *et al.*, 1996). En este experimento se empleó el método descrito por Orosa *et al.* (2005), que además de ser un método de baja toxicidad es más económico por la composición de sus eluyentes (Acetona:Metanol:Agua). Con modificaciones en el gradiente de dilución y el flujo de los solventes en la columna, el método resultó efectivo para separar los pigmentos que era necesario identificar y se ahorró el 50% del volumen de solventes en el método original.

En cuanto al contenido de pigmentos, existe gran cantidad de información sobre la producción de carotenoides en *Haematococcus*, sobre todo de astaxantina libre. Sin embargo, la comparación de los resultados obtenidos entre un autor y otro resulta complicada por la diversidad de las unidades reportadas. La unificación de los resultados se vuelve una tarea exhaustiva debido a la falta de estandarización en las unidades que reportan los pigmentos (Sarada, 2002). También debe tomarse en cuenta que las diferencias en el contenido de pigmentos en todos los estudios de inducción, se deben principalmente a las condiciones del medio que se le proporcionó al cultivo, a pesar de ser la misma especie, su composición bioquímica incluyendo el contenido de pigmentos se ve afectado por los diversos factores de estrés, la temperatura y del tiempo que se evalúa el cultivo (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002).

La limitación de  $\text{NaNO}_3$  y adición de  $\text{NaCl}$  en el medio de cultivo favorecieron la acumulación de pigmentos carotenoides en la cepa de *Haematococcus* sp., alcanzando un máximo de astaxantina libre de  $27.5 \text{ mg g}^{-1}$  (2.7%) con el tratamiento de 0.034 M y 100% de  $\text{NaNO}_3$ , seguido de  $10.3 \text{ mg g}^{-1}$  (1%) con el tratamiento de 0 M y 100% de  $\text{NaNO}_3$  ambos en el día 8 de cultivo. Estos resultados son mayores a los reportados por Cifuentes *et al.* (2003) quienes reportan un máximo de  $10.2 \text{ mg g}^{-1}$  (1%) al estresar *H. pluvialis* con  $\text{NaCl}$  0.13 M.



Al limitar de  $\text{NaNO}_3$  el cultivo sin añadir sal (0%  $\text{NaNO}_3$  y 0 M) se obtuvo un contenido máximo de  $1.26 \text{ mg g}^{-1}$  en el día 2, que es un contenido mayor al que reporta Orosa *et al.* (2001) ( $0.32 \text{ mg g}^{-1}$ ) con las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, Boussiba *et al.* (1999) reportan un contenido de hasta  $2.6 \text{ g L}^{-1}$  (4%) al limitar de nitrógeno el cultivo de *H. pluvialis*. De acuerdo con Orosa *et al.* (*op. cit.*) la producción y síntesis de astaxantina en *Haematococcus* sp. requiere de nitrógeno en el medio, y se comprueba con la necesidad de producción de proteínas que aumenten el tamaño de la célula para poder almacenar el pigmento, este comportamiento explica el alto contenido de astaxantina que se obtiene con cultivos en los cuales se mantiene el requerimiento óptimo de nitrógeno con respecto a aquellos en los que se ve limitado.

Por otro lado, aunque la limitación de nitratos y la adición de sal es una alternativa efectiva para la acumulación de astaxantina en los cultivos de *Haematococcus* sp., el crecimiento celular se ve afectado por disminución en la densidad celular y, como consecuencia de esto, el rendimiento del cultivo disminuye (Orosa *et al.*, 2001; Cifuentes *et al.*, 2003). Esta respuesta se comprobó con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el mayor rendimiento del cultivo ( $0.38 \text{ mg L}^{-1}$ ) se obtuvo con el tratamiento 0 M y 100% de  $\text{NaNO}_3$ , y no con el tratamiento de mayor producción de astaxantina 0.034 M con 100%  $\text{NaNO}_3$  ( $0.23 \text{ mg L}^{-1}$ ).

En cuanto al contenido de luteína, el mayor contenido se obtuvo con la combinación de 0.034 M NaCl y 100% de  $\text{NaNO}_3$  ( $22.4$  y  $28.3 \text{ mg g}^{-1}$ ) en los días 2 y 8, cuyos valores corresponden a un 2.1 y 2.9% del total de pigmentos presentes en la muestra. De acuerdo con Lorenz y Cysewski (2000), del contenido total de pigmentos en las células vegetativas de *Haematococcus*, una fracción de entre el 70 y el 80% se compone de luteína, por lo que es posible que el contenido de luteína presente se debió principalmente a que éste es un pigmento precursor de los carotenoides en la ruta de biosíntesis, entre los que se obtiene la astaxantina, esto aunado a una gran cantidad de células en fase vegetativa (Ambati *et al.*, 2014).

Los contenidos máximos de cantaxantina ( $3.5$  y  $2.4 \text{ mg g}^{-1}$ ) se obtuvieron con la combinación de 0.034 M y 100% de  $\text{NaNO}_3$  en los días 8 y 14. Estas concentraciones son superiores a las reportadas por Orosa *et al.* (2001) (máx.  $0.50 \text{ mg g}^{-1}$ ) al cultivar *H. pluvialis* en condiciones similares, en ausencia de nitrógeno. Boussiba (2000) describe que *H. pluvialis*, por medio de la enzima “ $\beta$ -caroteno hidroxilasa”, es capaz de utilizar la cantaxantina como sustrato en una de las principales rutas metabólicas para la conversión de astaxantina. Debido a la importancia de la cantaxantina como precursor del pigmento astaxantina, fue relevante para este trabajo analizar su contenido en cultivo.

En relación al  $\beta$ -caroteno, su producción se detectó a partir del día 2, y alcanzó su máximo contenido en el día 8 ( $18.4 \text{ mg g}^{-1}$ ) con la combinación de  $0.034 \text{ M}$  y  $100\%$  de  $\text{NaNO}_3$ , al igual que la astaxantina, la luteína y la cantaxantina. Orosa *et al.* (2001) reportan un contenido máximo de  $1.08 \text{ mg g}^{-1}$ , al cultivar *H. pluvialis* bajo altas concentraciones de nitratos ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). De acuerdo con Roy *et al.* (2011) el  $\beta$ -caroteno es el precursor de la cantaxantina y zeaxantina, y por ello es precursor primario de la astaxantina. Se ha demostrado que el  $\beta$ -caroteno es la molécula principal que se libera del citosol de la célula para la biosíntesis de astaxantina por procesos enzimáticos, convirtiéndolo en el precursor más importante en la acumulación de este pigmento.

En relación a los contenidos de clorofila  $a$ , se obtuvo el mayor contenido el segundo día de evaluación con el tratamiento  $0.034 \text{ M}$  en combinación con  $100\%$  de  $\text{NaNO}_3$  ( $172 \text{ mg g}^{-1}$ ). Los tratamientos con  $0 \text{ M}$  y  $100 \text{ NaNO}_3$  y  $0.034 \text{ M}$  con  $0\%$   $\text{NaNO}_3$  obtuvieron resultados similares en el mismo día de cultivo ( $147.8$  y  $152.1 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Con la exposición continua a condiciones de estrés en el cultivo, se espera que el contenido de clorofila  $a$  sea mayor en los primeros días de cultivo, ya que una respuesta natural ante la acumulación de astaxantina provoca una relación inversamente proporcional a la capacidad para realizar fotosíntesis, y por ende el contenido de clorofila  $a$  suele ser menor, y la disminución de la actividad fotosintética de las células se atribuye principalmente a posibles daños en el fotosistema II (Boussiba, 2000). La respuesta fisiológica descrita por Boussiba (2000) explica el comportamiento del contenido de pigmentos que se obtuvo en este experimento, debido a que el tratamiento con mayor contenido de astaxantina ( $27.5 \text{ mg g}^{-1}$ ) obtuvo solo  $20 \text{ mg g}^{-1}$  de clorofila  $a$ , ambos valores en el mismo día de cultivo.

Además, en el día 8 el tratamiento con  $0 \text{ M}$  y  $100\%$   $\text{NaNO}_3$  se produjeron  $141.4 \text{ mg g}^{-1}$  de clorofila  $a$ , y los segundos valores más altos fueron en el contenido de los pigmentos luteína ( $14.33 \text{ mg g}^{-1}$ ), cantaxantina ( $2.03 \text{ mg g}^{-1}$ ) y  $\beta$ -caroteno ( $7.50 \text{ mg g}^{-1}$ ); estos resultados indican que las células continuaron su reproducción y que una fracción importante de la biomasa celular produjo pigmentos carotenoides por efecto de la exposición a una intensidad de luz de  $400 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Además, es posible que las células de *Haematococcus* sp. y algunas otras especies de microalgas verdes acumulen ketocarotenoides como la astaxantina durante su fase vegetativa (Roy *et al.*, 2011).

Se debe resaltar que la microalga *Haematococcus* empleada en este estudio fue aislada localmente, y todos los resultados obtenidos serán útiles para futuros estudios para su caracterización y finalmente su producción masiva. Esta cepa produjo altas concentraciones de pigmentos de interés biotecnológico, como la astaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. La temperatura de 21°C y la intensidad de luz entre 20 y 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fueron las condiciones que favorecieron el crecimiento de *Haematococcus* sp.
2. El medio de cultivo que produjo las mayores densidades celulares de *Haematococcus* sp. fue el fertilizante agrícola Plantafol, con densidades mayores a las generadas con medio selectivo MBB.
3. Los factores de estrés como la limitación de nitratos en el medio, la adición de sal y la exposición a altas intensidades de luz, así como sus interacciones favorecieron la acumulación de pigmentos carotenoides en las células de *Haematococcus* sp.
4. Los contenidos más altos de clorofila se obtuvieron en el segundo día de evaluación en los tratamientos con 0 y 0.034 M en combinación con 0 y 100% de  $\text{NaNO}_3$  del MBB.
5. La mayor producción de pigmentos carotenoides se obtuvo con la salinidad de 0.034 M en combinación con 100% de  $\text{NaNO}_3$  del MBB, con una intensidad de luz de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ).
6. Los mayores contenidos de astaxantina, luteína, cantaxantina y  $\beta$ -caroteno se obtuvieron en los días 6 y 8, y disminuyeron su concentración en el día 14.

## Capítulo 6. Literatura citada

---

- Affenzeller M. J., Darehshouri A., Andosch A., Lütz C., Lütz-Meindl U. 2009. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Mirasterias denticulata*. *Experimental botany*, 60 (3): 939-954.
- Albarracín, I. 2007. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad, Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. XV Simposio electrónico Internacional.
- Allewaert C., Vanormelingen P., Pröschold T., Gómez P., González M., Bilcke G., D'Hont S., Vyverman W. 2015. Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Phycologia*, 54 (6): 583-598 p.
- Al-Qasbi M., Raut N., Talebi S., Al-Rajhi S., Al-Barwani T. 2012. A Review of effect of light on microalgae growth. *Proceedings of the world, Congress on engineering*.
- Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., Aswathanarayana R. G. 2014. Astaxanthin: sources, extraction stability, biological activities and its commercial applications- A review. *Marine drugs*, 12, 128-152.
- Bai J. N., Nair B. B., Shashirekha V. 2016. Nomenclature, taxonomy, reproduction and life cycle of the genus *Haematococcus*, *Haematococcaceae*, Chlorophyceae. *Phycological society*, 46 (1): 64-70.
- Barajas, A., Garzón, L., González, A., Guzmán, A., Kafarov, V., Moreno, N., Núñez, M., Plata, V., Velásquez, G. 2009. Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel. Centro de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía, Universidad Industrial de Santander, Instituto Colombiano del Petróleo icp ecopetrol, Instituto Corporación Morrosquillo.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae, biotechnology and microbiology*. Cambridge studies in biotechnology 10. Cambridge University Press. 293.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. Research review paper. *Journal of Biotechnology Advances*. 25: 207-210.
- Ben-Amotz, A., Polle, J. E.W. y Rao, D.V. S. 2009. The alga *Dunaliella*, Biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. Science publisher. 555.
- Bernhard, K. 1989. Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialization. En: *Carotenoids, Chemistry and biology*. Dept. of vitamin and nutrition research. Basle, Switzerland. 337-363.
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108 (2), 111-117.
- Boussiba, S., Bing W., Yuan J., Zarka A., Chen F. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology letter*, 21: 601-604.
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A. 1991. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green algae *Haematococcus pluvialis*. *Methods in Enzymology*. 213: 386-391.

- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M. A., Moulton, T. P. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* (116/117): 115-121.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka L. J. 1988. *Dunaliella*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (eds). *Microalgal biotechnology* Cambridge University Press. Australia. 477.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M. A., Kessly D. 1990. Effect of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of applied phycology*, 2: 111-119.
- Borowitzka, M. A. 1998. Limits to growth. En: Wong, Y.S. y Tam, N.F.Y. (eds) *Wastewater treatment with algae*. Springer, Berlin. 203-226.
- Brinda B. R., Sarada R., Kamath B. S., Ravishankar G. A. 2004. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*, cultural and regulatory aspects. *Current science*, 87(9): 1290-1294.
- Bubrick, P. 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technology* (38) 237-239.
- Cañizares-Villanueva, R. O., Perales-Vela, H. V. 2011. Producción de carotenoides a partir de las microalgas. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV. Facultad de estudios superiores Iztacala. Laboratorio de bioquímica. 9.
- Calero-Estévez, A. B. 1998. Optimización del cultivo y de la inducción a la carotenogénesis de la microalga *Haematococcus* sp. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de Acuicultura. 64.
- Chan M-C., Ho S-H., Lee D-J., Chen C-Y., Huang C-C., Chang J-S. 2013. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochemical Engineering Journal*, 78: 24-31.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, Z. R., Flores-Cotera, L. B. 2010. Una vista integral de la síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. *Dep. Biotecnología y Bioingeniería*, (14/3): 24-38.
- Cifuentes, A., González, M., Vargas, S., Hoeneisen, M., González, N. 2003. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.* 36: 343-357.
- Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C., Costa, J. A. V. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource technology*, 98 (7): 1489-1493.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B. O., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology letters*. 18(2): 213-218.
- Davison, I. R. 1991. Minireview of Enviromental effects on algal photosynthesis: temperatura. *Phycology*, 27: 2-8.
- Droop, M. R. 1961. *Haematococcus pluvialis* and its allies; III: Organic nutrition. *Rev. Algol. N. S.* 5: 247-259.

- Elliott, M. A. 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Arch. Protistenk. 82: 250-271 p.
- El Baz, F. K., Aboul-Enein, A. M., El-Baroty, G. S., Youssef, A. M., Abdel-Baky, H. H. 2002. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. OnLine Journal of Biological Sciences. 2(4): 220-223 p.
- Escuredo-Vielba, R. 2014. Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de Acuicultura. 52.
- Fábregas, J., Domínguez, A. García A., D., Lamela, T., Otero, A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology letters, 20 (6): 623-626.
- Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol, 53: 530-535 p.
- Frei, B. 1995. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. Crit. Rev. Food. Sci. Nutri. 35: 83-98.
- Gimpel, J. A., Hyun, J.S., Schoepp, N. G., Mayfield, S. P. 2014. Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale. Cellular and metabolic engineering. Doi: 10.1002/bit.25357
- González-Muñoz, J. A. 2006. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium creuntum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de acuicultura. 64.
- Göksan T., Ak I. 2006. Vegetative growth of the green alga *Haematococcus pluvialis* cultivated in different light-path lengths. Asian journal of plant sciences, 5 (3): 455-460.
- Göksan T., Ak I., Kiliç C. 2011. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of fisheries and aquatic Sciences, 11: 377-389.
- Gorain P. C., Bagchi S. K. y Mallick N. 2013. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulations in two green microalgae. Enviromental technology, Doi: 10.1080/09593330.2013.812668.
- Guedes, A. C., Malcata, F. X. 2012. Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. Aquaculture, Muchlisin, Z. (Ed.) 390 pp. Recuperado el 12 de mayo del 2015 en: <http://www.intechopen.com/books/aquaculture/nutritional-value-and-uses-of-microalgae-in-aquaculture>
- Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Review. Trends in biotechnology, 21, 5: 210-216.

- Guerrero, M. G., Rodríguez, H., Vargas, M. Á., García-González, M. Del Campo, J. A., Moreno, J y Rivas, J. 1999. Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. En: (ed.) Guerrero, M. G., Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados: Universidad de Coruña, IV Simposio Científico en Biología Celular y Molecular: 215-232.
- Handayaniam, N. A., Ariyantib, D., Hadiyanto. 2012. Potential production of polyunsaturated fatty acids from microalgae. Open Access Scientific Reports. 1:80, 1-4. doi: 10.4172/scientificreports.180
- Harrison P. J., Thompson P. A., Calderwood G. S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. Journal of applied phycology. 2: 45-56.
- Henriques, M., Silva, A., Rocha, J. 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. Communicating current and educational topics and trends in applied microbiology, A. Méndez-Vilas (Ed.).
- Hooker S. B., Heukelem L. V. 2011. An investigation into HPLC Data Quality Problems. Technical publication. National Service Information Service. NASA Center for Aerospace Information.
- Ho Shih-Hsin, Chen Chun-Yen, Chang Jo-Shu. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquos* CNW-N. Bioresour Technol 113: 244-52.
- Hong M., Hwang S. K., Chang W. S., Kim B. W., Lee J., Sim S. J. 2015. Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven Haber-Weiss reaction. Appl. Microbiol. Biotechnol. Doi: 10.1007/s00253-015-6440-5
- Hu, Q. 2004. Environmental Effects on Cell Composition, en Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, Oxford. (Edi) Richmond, A. 83-93 pp.
- Imamoglu E., Dalay M. C., Sukan F. V. 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. New biotechnology, 26 (3/4): 199-204.
- Johnson, E. A., An, G.-H., 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnology 11(4), 297-326.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by green algae, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetato media. J. Ferment Bioeng. 71: 335-339.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol 84 (1): 94-97.
- Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. Free radical biology and Medicine Journal. (7): 617-635.
- Lorenz, R. T. 1999. A technical review of *Haematococcus* algae. NatuRose, Technical Bulletin #060. Cyanotech Corporation. 12.

- Lorenz, R. T., Cysewski, G, R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Tib. Tech. (18). Cyanotech Corporation. 160-167.
- Mendes-Pinto M. M., Raposo M. F. J., Bowen J., Young A. J., Morais R. 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. Journal of applied phycology, 13:19-24.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. Journal of Applied Phycology. 12(3-5): 527-534.
- Nagaraj S., Rengasamy R. 2012. Antioxidant and anticancer potential of *Haematococcus pluvialis* Flotow, astaxanthin against hepatocarcinogenesis. Lap Lambert, Academic Publishing 109 pp.
- Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. 2001. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* mixotrophic growth. Biotechnology letters, 23: 373-378 p.
- Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Bioresource technology, 96: 373-378 p.
- Pan, C., Chein, Y., Cheng, J. 2001. Effects of light regime, algae in the water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* post-larvae. Zoological studies 40(4): 371-382.
- Patil, V., Reitan, K. I., Knutsen, G., Mortensen, L.M., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerod, H.R. 2005. Review: Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. Review. Current Topics in Plant Biology vol. 6.
- Perera C. O., Mei Yen G. 2007. Functional properties of carotenoids in human health. International journal of food properties, Doi: 10.1080/10942910601045271.
- Priyadarshani I., Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae- A review. Algal Biomass Utln. 3(4): 89-100.
- Ras, M., Steyer, J-P., Bernard O. 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. Rev Environ Sci Biotechnol, 12:153-164.
- Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, Oxford. 556.
- Richmond A., Hu Q. 2013. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Blackwell Science, Oxford. 2nd. edition 556.
- Roy S., Llewelyn C. A., Skarstad E., Johnsen G. 2011. Phytoplankton pigments, Characterization, Chemotaxonomy, and application in Oceanography. Cambridge University press, 1st edition. 846 p.
- Sánchez-Saavedra, M. P., Voltolina, D. 2002. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigments content of three diatom species in batch cultures. J. Ciencias marinas, 28 (3): 273-279.

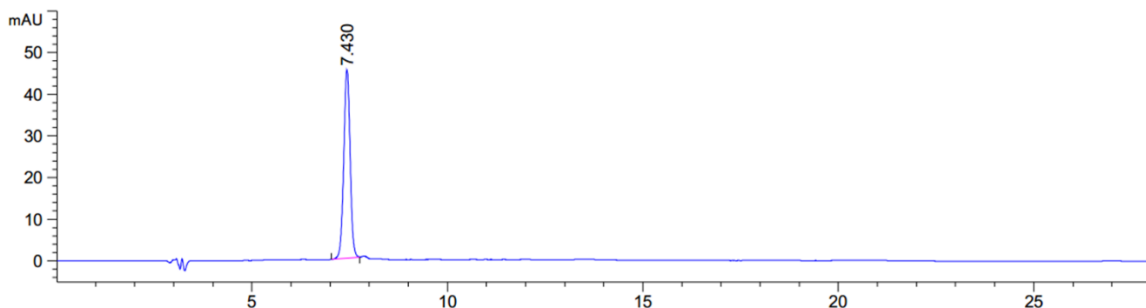


- Sarada R., Tripathi U., Ravishankar G. A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus* sp. grown under different culture conditions. *Process biochemistry*, 37: 623-627.
- Shah Md. M. R., Liang Y., Cheng J. J., Daroch M. 2016. Review, Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*. Doi: 10.3389/fpls.2016.00531
- Shahidi, F., Brown, J.A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science*. 38(1): 1-67.
- Singh, S. P., Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: a Review. *Renewable and sustainable energy reviews*. 50: 431-444 p.
- Steven, D.M. 1948. Studies on animal carotenoids. I. Carotenoids of the brown trout (*Salmo trutta* Linn.). *Journal Exp. Biol.* (25) 239.
- Tam L. T., Hoang D. D., Ngoc D. T., Hoai N. T., Hong, D. D. 2012. Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalgae *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for twophase culture of astaxanthin production. *Tap. Chi Sinh Hoc*, 34: 213-223.
- Takagi M., Yoshida K. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 223-226.
- Torrissen, O.J.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D., 1989. Pigmentation of salmonids - carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 209-225.
- Torzillo, G., Vonshak, A. 2013. Environmental stress physiology with reference to mass cultures. En: Richmond, A. y Hu, Q. (eds). *Handbook of microalgal culture*. 90-113.
- Tripathi U., Sarada R., Ramachandra S., Ravishankar G.A. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68: 197-199.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán Núñez, R., Núñez-Cebrero, Filiberto. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural engineering*, 20, 135-147.
- Valenzuela-Espinoza, E., Lafarga-De la cruz, F., Millán Núñez, R. y Núñez-Cebrero, F. 2005. Crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Rhodomonas* sp. cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas*, 31(1A): 79-89.
- Velasco L. A., Barros-Gómez J., Ospina-Salazar G. y Trujillo C. A. 2009. Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (CLON-T-ISO). *Intrópica*, 4: 93-99.
- Wan M., Zhang J., Hou D., Fan J., Li Y., Huang J. y Wang J. (2014). The effect of temperatures on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cycling cultivation. *Bioresource Technology*, 167: 276-283.

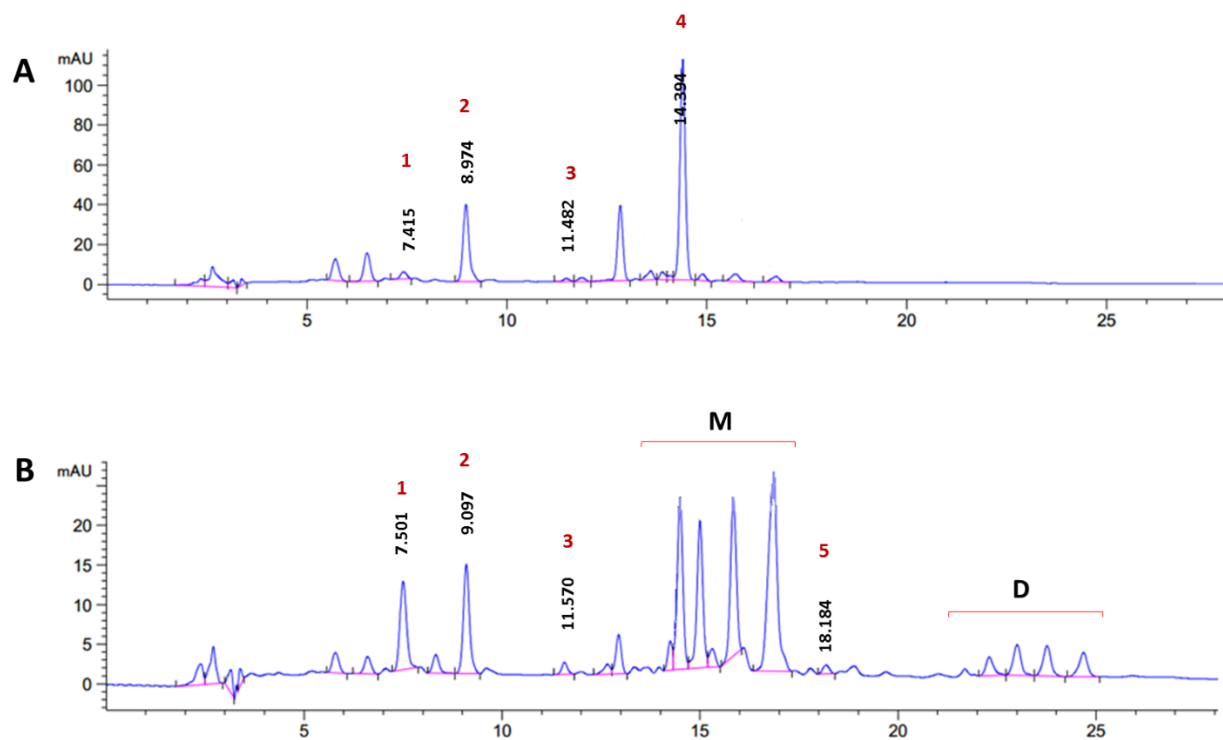
- Yashai, M. 2009. Carotenoid production by halophilic Archea and its applications. Tesis de Doctorado: Doctor of Philosophy in food technology, Songkla University. 173.
- Yuan J-P., Gong X-D., Chen F. 1996. Separation and identification of astaxanthin esters and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by HPLC. *Biotechnology techniques*, 10 (9): 655-660.
- Zachleder V., Bišová, K. y Vítová M. 2016. The cell cycle of microalgae. En: Borowitzka M., Beardall J., y Raven J. A. (eds). *The Physiology of Microalgae*. 3-63.
- Zepeda-Lupio, E. 2017. Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de Acuicultura.

## Anexos

### ANEXO I



Cromatograma de HPLC (476 nm) del estándar de astaxantina libre (DHI; 3S, 3'S-astaxantina), cuyo tiempo de retención aparece en el min 7.430.



Cromatogramas de HPLC (476 nm) de los pigmentos de *Haematococcus* sp. en los días 0 (A) y 8 (B) en cultivo (con NaCl 0.034 M, 100% NaNO<sub>3</sub> y 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Se identificaron los pigmentos: astaxantina libre (1); luteína (2); cantaxantina (3); clorofila *a* (4);  $\beta$ -caroteno (5). Se señalan probables monoésteres (M) y diésteres (D) de astaxantina.