

Tesis defendida por  
Raquel Escuredo Vielba  
y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Codirectora de tesis

---

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Codirectora de tesis

---

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo  
Miembro del Comité

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Miembro del Comité

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Coordinador  
del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

Abril 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura

---

Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Raquel Escuredo Vielba

Ensenada, Baja California, México

2014

Resumen de la tesis de Raquel Escuredo Vielba, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo

Resumen aprobado por:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Codirectora de tesis

---

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Codirectora de tesis

Los estudios sobre microalgas han aumentado considerablemente en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones, tanto en la acuicultura como en la producción de compuestos con alto valor comercial, como los ácidos grasos poliinsaturados y los pigmentos carotenoides. Entre las microalgas que han sido postuladas para estudios a nivel de investigación en laboratorio y en el escalamiento masivo para la producción de pigmentos carotenoides, está la microalga *Haematococcus pluvialis*. Trabajos previos sobre esta especie indican que bajo condiciones de estrés acumula el pigmento carotenoide astaxantina, mismo que ha sido utilizado para su inclusión en dietas para peces y como complemento alimenticio en dietas para humanos. La microalga *Haematococcus* sp., fue aislada localmente, por lo que, con la intención de identificar las condiciones adecuadas para su cultivo, en este trabajo se evaluaron diferentes medios a base de fertilizantes agrícolas: Miracle Gro (MG), Plantafol (PT), Nitrocel+agro-K (NA), Bayfolán (BF) y como cultivo control el Medio Basal Bold (MBB), así como tres intensidades de luz (60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las mayores biomásas ( $72.0\times 10^4$  cél $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se obtuvieron con el medio de cultivo Plantafol e intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y las densidades celulares más bajas se obtuvieron con los fertilizantes agrícolas NA y BF en todas las intensidades de luz estudiadas. Con respecto a la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos) de los dos fertilizantes seleccionados del primer ensayo (MG y Plantafol) y el medio control (MBB). En general no se observaron diferencias en la composición bioquímica entre los fertilizantes agrícolas y el medio control. Para analizar la producción de carotenoides, los cultivos de *Haematococcus* se sometieron a estrés con y sin limitación total de nutrientes e intensidad de luz de 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . El resultado de este estudio indica que el efecto interactivo de la limitación de nutrientes y alta intensidad de luz, favoreció la formación de pigmentos carotenoides.

Palabras clave: **Microalga, *Haematococcus*, cultivo, carotenoides**

Abstract of the thesis presented by Raquel Escuredo Vielba as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Evaluation of the biomass produced by the microalgae *Haematococcus* sp. Induction and carotenogenesis under different culture conditions

Abstract approved by:

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Codirectora de tesis

---

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Codirectora de tesis

Studies on microalgae have greatly increased in recent years due to their multiple applications in both aquaculture and production of high-value compounds, such as polyunsaturated fatty acids and carotenoid pigments. Among the microalgae postulated at research level for laboratory studies and in mass scaling for the production of carotenoid pigments is the microalgae *Haematococcus pluvialis*. Previous studies on this strain indicate that under stressful conditions it accumulates the carotenoid pigment astaxanthin, this pigment has been used for inclusion in fish diets and as a dietary supplement in human diets. The microalgae *Haematococcus* sp., was isolated locally, therefore, with the intention to identify the adequate conditions for its culture, in this work different mediums based on agriculture fertilizers were evaluated: Miracle Gro (MG), Plantafol (PT), Agro K + Nitrocel (NA) and Bayfolan (BF) and as a control culture Bold's Basal Medium (BBM) was used, as well as three different light intensities (60, 80 and 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Highest biomass ( $72.0 \times 10^4 \text{ c\acute{e}l} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was obtained with the culture medium Plantafol and light intensity of 60  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and the lowest cell densities were obtained with agricultural fertilizers NA and BF in all light intensities studied. Regarding the biochemical composition (proteins, carbohydrates, lipids and fatty acids) of the two fertilizers selected from the first essay (MG and Plantafol) and control medium (BBM). In general no overall no difference in the biochemical composition was found between agricultural fertilizers and control medium. To analyze the production of carotenoids, *Haematococcus* cultures were submitted to stress with and without full nutrient limitation and light intensity of 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . The result of this study indicates that the interactive effect of nutrient limitation and high light intensity, favored the formation of carotenoid pigments.

**Keywords: Microalgae, *Haematococcus*, culture, carotenoids.**

*Para las personas que me enseñaron a ser quien soy: A mis padres.  
A mis hermanos, a los que quiero con locura a pesar de la distancia.  
Gracias por apoyarme siempre.*

Agradecimientos:

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por haberme otorgado la oportunidad de realizar mi maestría.

A CONACYT, por el apoyo económico a través de la beca para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A mis directoras de tesis, la Dra. Beatriz Cordero Esquivel y la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, gracias por los ánimos cuando todo parecía salir al revés, por los buenos consejos y sobre todo por lo mucho que me han enseñado.

A los miembros del comité de tesis: Dra Bertha Lavaniegos Espejo y Dr Benjamín Barón Sevilla por su ayuda y recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura, Norberto Flores Acevedo, Luis Alberto Murillo Valenzuela, José Espinoza Ibarría y en especial a Adrián Celaya, por su ayuda en el montaje de los sistemas.

A mis compañeros de generación: Pablo, Roberto, Rigo, David, Jorge, Luis, Miriam, Araceli y Omar, gracias por lo que he aprendido de cada uno de vosotros.

A Vivi, Sara y Faby, por el soporte técnico y moral, gracias chicas!!

A mis amigas en Ensenada: Amparo, Elena, Lucía, Paulette, Mariela y Salma...México es mucho mas bonito gracias a todas vosotras.

A mis amigas de toda la vida, esas que siempre me acompañan, me animan y que llevan a mi lado casi desde que nací

A toda la gente que me ha acompañado a lo largo de estos cuatro años en México, con los que he vivido muchas experiencias que nunca olvidaré...gracias a todos!!!

Y a ti...Pablo, por las risas, por la ayuda, por los ánimos... Gracias por quererme tanto.

## Contenido

	Página
Resumen español .....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tablas .....	x
Capítulo 1 Introducción .....	1
Justificación .....	7
Capítulo 2 Hipótesis .....	8
Objetivos .....	8
Capítulo 3 Material y métodos .....	9
3.1 Origen de la cepa .....	9
3.2 Producción de biomasa .....	9
3.3 Experimento preliminar .....	10
3.4 Evaluación de medios de cultivo e intensidades de luz .....	10
3.5 Composición bioquímica de <i>Haematococcus</i> sp. ....	13
3.6. Inducción a la carotenogénesis .....	14
3.6.1 Extracción y análisis de pigmentos .....	15
3.7 Análisis estadístico .....	16
Capítulo 4. Resultados .....	17
4.1 Obtención de biomasa y optimización del cultivo.....	17
4.2 Evaluación del crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp., con diferentes medios de cultivo e intensidades de luz.....	19
4.3 Evaluación de la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de la biomasa producida por <i>Haematococcus</i> sp.....	23
4.3.1 Composición proximal .....	23

4.3.2 Composición de ácidos grasos de <i>Haematococcus</i> sp. ....	27
4.4 Inducción a la carotenogénesis.....	31
4.4.1 Experimento 1. Cultivo de <i>Haematococcus</i> sp., sin reemplazo de nutrientes y con un incremento en la intensidad de luz a $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a partir del día 6 de cultivo .....	31
4.4.2 Experimento 2. Cultivo de <i>Haematococcus</i> sp., con reemplazo total de nutrientes y con un incremento en la intensidad de luz a $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a partir del día 10.....	34
Capítulo 5 Discusión .....	39
Conclusiones .....	45
Referencias bibliográficas .....	46



## Lista de figuras

Figura		Página
1	Diseño experimental para la optimización del cultivo de <i>Haematococcus</i> sp., en diferentes intensidades de luz (60, 80 y 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y medios de cultivo formulados con base en cuatro fertilizantes agrícolas...	12
2	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada en Medio Basal Bold, con intensidad de luz de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).....	17
3	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada en el medio Miracle Gro (MG), con intensidad de luz de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).....	18
4	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con cinco medios a base de fertilizantes agrícolas y una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	19
5	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con cinco medios a base de fertilizantes agrícolas y una intensidad de luz de 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	20
6	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con cinco medios a base de fertilizantes agrícolas y una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	21
7	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada a 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en tres medios a base de fertilizantes agrícolas. ....	24
8	Porcentaje de proteínas de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada a una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en tres medios a base de fertilizantes agrícolas.....	25
9	Porcentaje de carbohidratos de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada a una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y en tres medios a base de fertilizantes agrícolas.....	26
10	Porcentaje de lípidos de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada a una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y en tres medios a base de fertilizantes agrícolas.....	27
11	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios, con una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta el día 6 y un incremento posterior a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	31
12	Contenido de carotenoides totales de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios, con una intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta el día 6 y un incremento posterior a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	32

13	Porcentaje de la clorofila <i>a</i> de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios y con una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta el día 6 y un incremento posterior a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	33
14	Porcentaje de la clorofila <i>b</i> de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios y con una intensidad de luz de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta el día 6 y un incremento posterior a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	34
15	Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios y posterior eliminación de los nutrientes e incremento de la intensidad de luz a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Día 9).....	35
16	Porcentaje de carotenoides totales de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios, a una intensidad de luz de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.....	36
17	Concentración de clorofila <i>a</i> de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios, a una intensidad de luz de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.....	37
18	Concentración de clorofila <i>b</i> de <i>Haematococcus</i> sp., cultivada en tres medios, a una intensidad de luz de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.....	37

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Medios de cultivo utilizados para el cultivo de diferentes especies de microalgas marinas y dulceacuícolas.....	5
2	Composición del Medio Basal Bold 3N, formulado con base en la especificación de UTEX The culture Collection of Algae.....	10
3	Fuentes de los componentes mayoritarios (fósforo, potasio y nitrógeno) de los medios empleados en el cultivo de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. ....	11
4	Composición química y concentración de nutrientes de los fertilizantes empleados en el cultivo de la microalga <i>Haematococcus</i> sp.....	11
5	Tasas de crecimiento ( $\mu\cdot d^{-1}$ ) de <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con dos medios de cultivo y con tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).....	18
6	Tasas de crecimiento ( $\mu\cdot d^{-1}$ ) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con cinco medios con base a fertilizantes agrícolas, en intensidades de luz de 60, 80 y 100 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	22
7	Concentración celular ( $cél\cdot mL^{-1}\cdot 10^4$ ) de <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con tres intensidades de luz (60, 80 y 100 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ ) y cinco medios de cultivo.....	23
8	Composición proximal (%) de <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes medios de cultivo y una intensidad de luz de 60 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	25
9	Composición de ácidos grasos saturados de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de 60 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	28
10	Composición de ácidos grasos monoinsaturados de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de 60 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	29
11	Composición de ácidos grasos poliinsaturados por la microalga <i>Haematococcus</i> sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de 60 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	30
12	Tasa de crecimiento ( $\mu\cdot d^{-1}$ ) de <i>Haematococcus</i> sp. cultivada en tres medios, con una intensidad de luz de 60 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ hasta el día 6 y un incremento posterior a 300 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ .....	32

13	Tasa de crecimiento ( $\mu \cdot d^{-1}$ ) de <i>Haematococcus</i> sp. cultivada en tres medios hasta el día 9 y posterior eliminación de los nutrientes e incremento de la intensidad de luz a $300 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ .....	35
14	Resumen comparativo de la producción de pigmentos carotenoides de <i>Haematococcus</i> sp.....	38

## Capítulo 1.

---

### Introducción

Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos con una gran diversidad de especies, se encuentran ampliamente distribuidas en la biósfera y se adaptan a una gran cantidad de condiciones, dependiendo de la especie, su tamaño puede variar desde una a cientos de micras (Caswell y Zilberman, 2000; Barsanti y Gualtieri, 2006).

La importancia de las microalgas se ha incrementado en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones: como complementos de dietas para humanos, en el tratamiento de aguas residuales, en la producción de compuestos bioactivos de alto valor comercial y recientemente por el interés que han generado para la producción de biocombustibles (Metting y Pyne, 1986; Lorenz y Cysewski, 2000; Richmond, 2004; Chisti, 2006 y Gouveia, 2011). Sin embargo, actualmente su uso más extendido es como base de la producción acuícola, ya que son parte integral de la producción de moluscos bivalvos y para el desarrollo de larvas de peces y crustáceos (Herrero *et al.*, 1991).

Uno de los aspectos más importantes para la producción de microalgas, es la selección del medio de cultivo químico, que sea económicamente apropiado para los diferentes volúmenes de producción. Cuando se trabaja con volúmenes grandes, el interés radica generalmente en el uso de fertilizantes de bajo costo que aseguren altas densidades celulares, así como una buena calidad nutricional de las células (Abalde *et al.*, 1995).

Entre las especies de microalgas que se usan comúnmente en la alimentación de especies marinas y dulceacuícolas se encuentran *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Rhodomonas* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Spirulina (Arthrospira)* spp., debido a su composición bioquímica y altas tasas de crecimiento (Dhert *et al.*, 2001, Habib *et al.*, 2008).

Es importante conocer la composición bioquímica de las microalgas, ya que no es constante, sino que varía en función de la especie, así como de las condiciones de cultivo. Sin embargo, es posible modificar la concentración y composición de los compuestos deseados, mediante el control de factores como la concentración y tipo de nutrientes, la temperatura, la intensidad de la luz y el pH. También es posible seleccionar la fase de crecimiento óptima para su cosecha (Saracco, 2003; Valenzuela- Espinoza *et al.*, 2005; Cerón *et al.*, 2007).

En función de las condiciones ambientales y/o de cultivo, algunas especies modifican el contenido de ciertos compuestos, entre estos destacan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y los pigmentos carotenoides, altamente demandados en el mercado internacional, como el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina.

El  $\beta$ -caroteno es el primer carotenoide natural producido a nivel industrial, cuya principal fuente natural es la microalga *Dunaliella salina* (Ben-Amotz y Avron, 1983; Borowitzka y Borowitzka, 1989; Hosseini *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2007;). Otro carotenoide de gran interés es la astaxantina, un cetocarotenoide derivado del  $\beta$ -caroteno que se caracteriza por poseer un grupo ceto (C=O) y un grupo hidroxilo (-OH) en los extremos cíclicos de la molécula, que le confieren un gran poder reactivo (Kobayashi *et al.*, 1992).

Este carotenoide es responsable del color de la carne de muchas especies marinas y de agua dulce que ingieren los microorganismos que sintetizan este pigmento (Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando algunos organismos son cultivados éste pigmento debe ser administrado en la dieta, como en el caso del salmón, la trucha y el camarón, ya que les proporciona el color rojo-anaranjado característico y contribuye a mejorar su apariencia aumentando así su valor comercial (Johnson *et al.*, 1991, Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). Además de su uso como colorante, su inclusión en la dieta mejora el crecimiento de los organismos y aporta notables beneficios en la reproducción y desarrollo larvario.

Múltiples estudios revelan la importancia de la astaxantina para la salud humana por su acción inmunoestimulante: en el caso del cáncer, proporciona protección contra los radicales libres, en enfermedades cardíacas ayuda a la reparación del daño causado por la falta de oxígeno en el tejido cardíaco, además ayuda a la disminución de los efectos perjudiciales del colesterol LDL, entre otras

(Guerin *et al.*, 2003; Pulz y Gross, 2004; Misawa, 2011). Otro campo del uso de la astaxantina es en la dermatología debido a su alta capacidad antioxidante (Spolaore *et al.*, 2006).

En la década de los años 80, se utilizaba principalmente astaxantina sintética, pero debido a sus altos costos (\$2,500-3,000 dls por kg) se buscaron fuentes naturales, como la producida por plantas superiores, por la levadura *Phaffia rhodozyma*, la bacteria *Halobacterium salinarum* y por la microalga *Haematococcus pluvialis* (Johnson *et al.*, 1991; Chávez-Cabrera *et al.*, 2010). La microalga *H. pluvialis* es considerada como la mejor fuente natural de astaxantina ya que puede acumular hasta el 5% de su peso seco de este pigmento (Sommer *et al.*, 1991, Boussiba *et al.*, 1999).

*Haematococcus* sp. es una microalga de agua dulce perteneciente a la clase Chlorophyceae. Es un biflagelado unicelular (célula vegetativa) que en condiciones de estrés pierde los flagelos, adoptando una forma denominada palmeloide, en la cual empieza a acumular pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina. Si el estrés continúa, la membrana celular se va endureciendo hasta alcanzar una forma de quiste llamada aplanospora. Esta se caracteriza por su color rojo y por poseer una pared celular extremadamente resistente que rodea la membrana plasmática, formada en su mayor parte por un compuesto semejante a la esporopoleína (Elliott, 1934; Hagen *et al.*, 2002). Cuando las condiciones de cultivo son adecuadas para el crecimiento, las células revierten su estado de aplanospora al de célula vegetativa y pierden la pared celular rígida, que es sustituida por una matriz gelatinosa más lábil e inician la degradación de la astaxantina (Fabregas *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2006).

A pesar del reconocido potencial de esta microalga, su cultivo está limitado por las dificultades para obtener grandes biomásas, lo que constituye uno de los principales retos para su producción a gran escala (Cifuentes *et al.*, 2003). Entre los factores que influyen en el crecimiento de *Haematococcus* están el medio de cultivo, la temperatura y la intensidad de luz. El cultivo de *Haematococcus* se ha realizado básicamente con medios químicamente definidos para especies de agua dulce, en donde se han evaluado diferentes concentraciones de nutrientes y fuentes de nitrógeno, potasio, sulfatos, etc. (Fábregas *et al.*, 2000, Calero-Estévez, 1998).

En los últimos años se han realizado diversos trabajos enfocados al estudio de los fertilizantes agrícolas como medios alternativos para el cultivo de microalgas (Tabla 1), tanto de agua dulce como marina, para así disminuir el costo de su producción, obteniendo microalgas de buena calidad, tanto por su densidad como por su perfil bioquímico (Valenzuela–Espinoza *et al.*, 2005; Piña *et al.*, 2007; Nieves-Soto *et al.*, 2001). Los fertilizantes agrícolas varían en su composición química y por ende en la concentración de nutrientes. Cuando una especie de microalga se cultiva con medios de cultivo elaborados a base de diferentes fertilizantes, el crecimiento y su composición proximal también varían. Todos los fertilizantes agrícolas contienen nitrógeno en la forma de diferentes especies químicas (amonio, urea, nitratos) que están biodisponibles para las microalgas, aunque la diferencia radica en el costo energético que su asimilación representa para las células. El amonio es la forma de nitrógeno que supone un menor gasto energético (Borowitzka *et al.*, 1991; Abalde *et al.*, 1995)

Además del medio de cultivo, la intensidad de luz es otro factor que influye de manera determinante en el cultivo de *Haematococcus* sp. La intensidad de luz óptima para su crecimiento está entre 26 y 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con las que se obtienen biomásas entre 100,000 a 300,000  $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Borowitzka *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1993; Cordero *et al.*, 1996; Calero-Estévez, 1998; Duk *et al.*, 2006a).



Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de diferentes especies de microalgas marinas y dulceacuícolas. FA = Fertilizantes agrícolas.

Espece	Medio de cultivo	Diferencia en cél•mL <sup>-1</sup>	Referencia
<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis galbana</i> .	“f/2”	FA ≥ f/2	Arredondo-Vega <i>et al.</i> (2012).
	FA		
<i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i> , <i>Isochrysis sp.</i>	“f”	FA ≥ f	Piña <i>et al.</i> (2007)
	FA		
<i>Monorajohidium sp.</i>	“f”	FA ≥ f	Nieves-Soto <i>et al.</i> (2001)
	FA		
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	“f/2”	No significativa	Acosta-Ortega (2010)
	FA		
<i>C. muelleri</i>	“f/2”	No significativa	Pacheco-Vega (2003)
	FA		
<i>Rhodomonas sp.</i>	“f/2”	No significativa	Valenzuela-Espinoza <i>et al.</i> (2005)
	FA		
<i>Porphyridium cruentum</i>	“f/2”	No significativa	González-Muñoz (2006)
	FA		

La carotenogénesis en *Haematococcus* sp., depende de varios factores que inducen la producción masiva de pigmentos, entre los principales están la limitación de nutrientes, principalmente el nitrógeno y el fósforo (Duk *et al.*, 2006b), las altas intensidades de luz (Boussiba y Vonshak, 1991; Calero-Estévez, 1998; Brinda *et al.*, 2004; Qiu y Li, 2006), altas temperaturas (González-Medina, datos no publicados) y la salinidad (Cordero *et al.*, 1996; Brinda *et al.*, 2004; Borowitzka *et al.*, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos a la fecha son contradictorios.

Los estudios relacionados con la limitación de nutrientes indican que bajas concentraciones de nitrógeno favorecen la formación de aplanosporas en *Haematococcus* sp. (Borowitzka *et al.*, 1991). Boussiba y Vonshak (1991) mencionan que la intensidad de luz adecuada para la producción masiva de axtasantina es de  $170 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En contraste, Harker *et al.* (1996), indican que el intervalo de intensidad de luz óptimo para la síntesis de astaxantina es de 1550 a  $1650 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Otro factor estresor estudiado es la salinidad, valores superiores al 1% resultan en muerte del cultivo de *Haematococcus* sp. (Borowitzka *et al.*, 1991), sin embargo, la adicción de NaCl en un rango de 0.2-0.8% es la mejor condición para la producción de astaxantina (Cordero *et al.*, 1996; Boussiba *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos por diversos autores en la búsqueda de la condición más adecuada para el cultivo de *Haematococcus* sp., son muy variados, por lo cual, en este trabajo se abordará el estudio de medios no convencionales e intensidades de luz para la optimización del cultivo y de la inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp., principalmente para lograr la mayor producción de pigmentos carotenoides.

**Justificación.**

Las microalgas tienen numerosas aplicaciones, que van desde la alimentación directa de organismos filtradores, hasta la obtención de compuestos con alto valor comercial, entre los que se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) y los pigmentos carotenoides, sin embargo, la producción masiva de microalgas implica un elevado costo de producción, por lo que la búsqueda de medios de cultivo alternativos y la condición óptima para lograr mayores biomásas sin comprometer la calidad es la principal tarea a abordar, por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de la microalga *Haematococcus* sp., aislada localmente, para la producción de pigmentos carotenoides, por lo cual, se evaluarán las condiciones de luz y el contenido de nutrientes para la producción de biomasa y para la producción de pigmentos carotenoides.

## Capítulo 2

---

### Hipótesis:

- Los diferentes medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas, propiciarán igual o mejor crecimiento y composición bioquímica que el Medio Basal Bold, en la microalga *Haematococcus* sp.
- El efecto interactivo de la limitación de nutrientes y altas intensidades de luz favorecerá un incremento en la producción de carotenoides en la microalga *Haematococcus* sp.

### Objetivos:

#### General

Evaluar el crecimiento y la producción de biomasa de la microalga *Haematococcus* sp., con medios de cultivo elaborados a base de fertilizantes agrícolas y cuantificar la producción de carotenoides bajo diferentes factores de estrés.

#### Específicos

- Evaluar el crecimiento de *Haematococcus* sp. con cuatro medios de cultivo alternativos y el control MBB a tres intensidades de luz.
- Evaluar la biomasa producida mediante el número de células, el peso seco total y orgánico y la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos), de *Haematococcus* sp. utilizando dos medios de cultivo elaborados a base de fertilizantes agrícolas y el Medio Basal Bold (MBB) como control.
- Evaluar la producción de carotenoides totales de *Haematococcus* sp. inducida con altas intensidades de luz y limitación de nutrientes.

## Capítulo 3:

---

### Material y métodos

#### 3.1. Origen de la cepa

La cepa de *Haematococcus* sp. que se utilizó en este trabajo fue recolectada en forma de aplanospora en el campus del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Fue aislada y reactivada en el Medio Basal Bold (MBB), utilizado para *Haematococcus* sp. por la Universidad de Texas (UTEX).

#### 3.2 Producción de biomasa

El cultivo de la microalga *Haematococcus* sp., se realizó mediante inóculos sucesivos desde 10 mL hasta 15 L, con el objetivo de producir la biomasa suficiente para los ensayos de evaluación de medios de cultivo. Los cultivos de 10 mL a 1 L se realizaron con agua destilada, previamente esterilizada en autoclave a 110 °C y 15 libras de presión. Para los cultivos de 15 L, la esterilización se realizó con cloro comercial (3 mL•L<sup>-1</sup>) por 24 h y posteriormente se agregó tiosulfato de sodio (150 mg•L<sup>-1</sup>) y aireación profusa para la eliminación total del cloro.

Los cultivos se iniciaron con el Medio Basal Bold 3N (MBB) (Tabla 2) y se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio: temperatura de 21±1°C, pH de 7-7.5, una intensidad de luz de 40 μmol•m<sup>-2</sup>•s<sup>-1</sup> y aireación continua para evitar la sedimentación de la microalga.

Tabla 2: Composición del Medio Basal Bold 3N empleado en el cultivo de la microalga *Haematococcus* sp., formulado con base en la especificación de UTEX The culture Collection of Algae.

Componente	Concentración
NaNO <sub>3</sub>	8.82 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29 mM
NaCl	0.43 mM

### 3.3 Experimento preliminar

Para determinar la concentración de nitrógeno más adecuada para el crecimiento celular, se realizó un experimento preliminar en un volumen de 60 mL. Los medios analizados fueron el MBB y el fertilizante agrícola Miracle Gro (MG) con tres concentraciones de nitrógeno, 8.82, 17.64 y 24.46 mM. Los cultivos se mantuvieron a una intensidad de luz de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , una temperatura de 21 °C y aireación continua.

### 3.4 Evaluación de medios de cultivo e intensidades de luz

Se evaluaron cuatro medios de cultivo formulados con fertilizantes agrícolas, y como control se utilizó el MBB (Tabla 2). En vista de que los fertilizantes seleccionados tienen las mismas fuentes de fósforo y potasio pero diferentes fuentes de nitrógeno (Tabla 3), los medios de cultivo se formularon con base en una concentración de 8.82 mM de nitrógeno, que es la concentración en que se encuentra en el MBB (3N) (Tabla 4).

Tabla 3. Fuentes de los componentes mayoritarios (fósforo, potasio y nitrógeno) de los medios empleados en el cultivo de la microalga *Haematococcus* sp. MBB (Medio Basal Bold), MG (Miracle Gro), NA (Nitrocel+Agro K)

Medio	Fuentes de K, P	Fuentes de N
MBB	$K_2HPO_4$ , $KH_2PO$	Nitrato de sodio.
MG	$K_2O$ , $P_2O_5$	N amoniacal y uréico
PLANTAFOL	$K_2O$ , $P_2O_5$	N amoniacal, uréico y nítrico.
NA	$K_2O$ , $P_2O_5$	N uréico
BAYFOLÁN	$K_2O$ , $P_2O_5$	No especificado por el fabricante

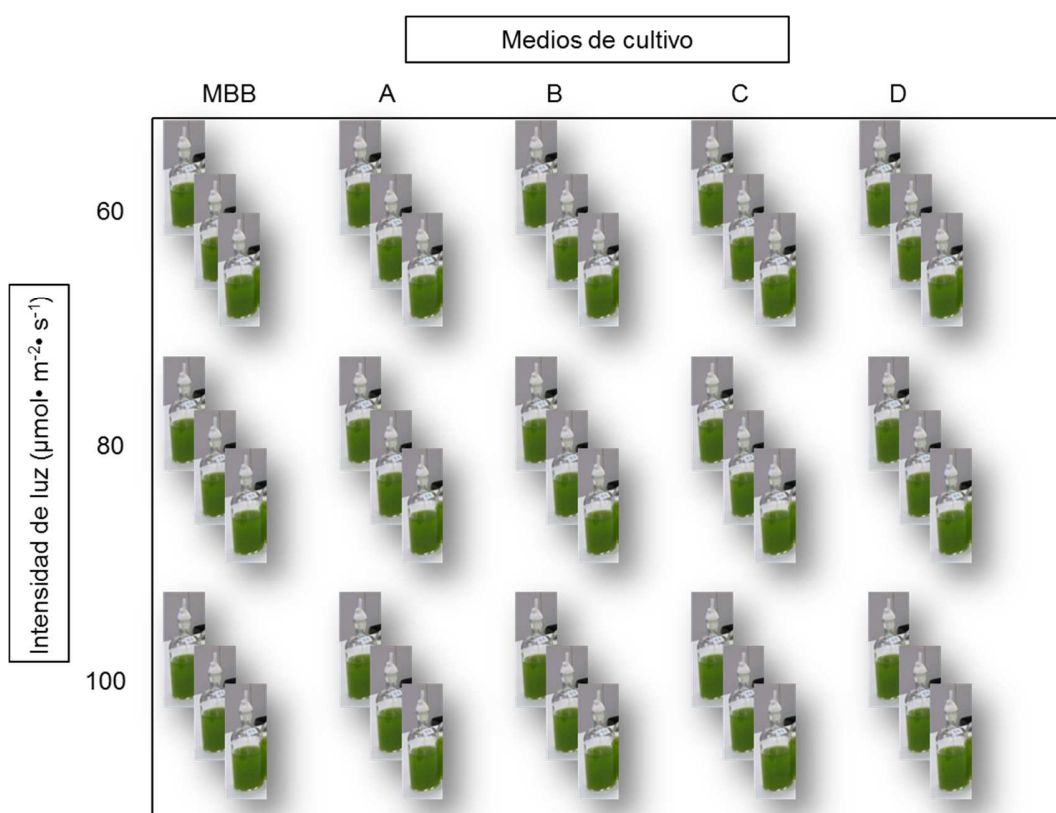
Tabla 4: Composición química y concentración de nutrientes de los fertilizantes empleados en el cultivo de la microalga *Haematococcus* sp. (Valores expresados en mM). MBB (Medio Basal Bold), MG (Miracle Gro), NA (Nitrocel+Agro K).

	MEDIOS DE CULTIVO				
	MBB	MG	PLANTAFOL	BAYFOLÁN	NA
N	8.82	8.82	8.82	8.82	8.82
P	1.62	1.74	0.87	0.26	1.62
K	2.05	1.31	1.31	0.56	4.05
B	0	0.015	0.011	0.04	0
Cu	0	0.009	0.005	0.007	0
Fe	0.36	0.022	0.011	0.009	0.36
Mn	0.21	0.007	0.006	0.007	0.21
Mo	0.017	0.0004	0	0.005	0.017
Zn	0.037	0.008	0.005	0.013	0.037
Co	0.008	0	0	0.004	0.008
Ca	0.17	0	0	0.003	0
Mg	0.3	0	0	0.004	0

La evaluación del crecimiento de *Haematococcus* sp. en los diferentes medios de cultivo e intensidades de luz, se inició con un inóculo de  $30,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en tubos de vidrio de 80 mL (con un volumen útil de 70 mL) y aireación continua. Los diferentes medios fueron expuestos a distintas intensidades de luz: 60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig.1).

Cada tratamiento se hizo por triplicado y con base en los resultados obtenidos se eligieron los medios de cultivo y la intensidad de luz en los que se cuantificó la mayor cantidad de biomasa, para continuar con los siguientes experimentos de *Haematococcus* sp.

El crecimiento se evaluó con base en el incremento de la densidad del cultivo ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Los recuentos celulares diarios se realizaron en un microscopio compuesto Primo Star, marca Carl Zeiss, utilizando una cámara de Neubauer o hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad



**Figura 1.** Diseño experimental para la optimización del cultivo de *Haematococcus* sp., en diferentes intensidades de luz (60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y medios de cultivo formulados con base en cuatro fertilizantes agrícolas (A= Miracle Gro; B=Plantafol; C= Bayfolán; D= Nitrocel+Agro K) y el medio Medio Basal Bold (MBB) como control.



### 3.5 Composición bioquímica de *Haematococcus* sp.

Con base en los resultados del experimento anterior se inició un nuevo ensayo en un volumen de 1L para evaluar la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de *Haematococcus* sp., cultivada en dos medios (MG y Plantafol) y a la intensidad de luz seleccionada (en base al experimento inicial). El inóculo inicial fue de  $30,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El diseño experimental consistió en una intensidad y dos medios de cultivo y cada combinación por triplicado, lo que resulta en un total de 6 unidades experimentales.

Como en el experimento anterior, el crecimiento se evaluó con base en el incremento de la densidad del cultivo ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos). Para analizar el peso seco y la composición bioquímica de *Haematococcus* sp. en las diferentes fases de crecimiento, se tomaron muestras de las seis unidades experimentales cada tercer día.

Para cuantificar el peso seco se concentró un volumen conocido del cultivo en filtros GF/C de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, previamente lavados, incinerados en la mufla a  $490^\circ\text{C}$  y pesados. Los filtros con microalgas se colocaron en una estufa a  $70^\circ\text{C}$  por 24 h, para obtener el peso seco total (PST), posteriormente se incineraron en una mufla a  $490^\circ\text{C}$  por 24 h, para cuantificar el peso de cenizas. Finalmente por diferencia entre el PST y las cenizas, se obtuvo el peso seco orgánico (PSO).

Las muestras del cultivo para el análisis bioquímico fueron centrifugadas a una velocidad de 3500 rpm, durante 15 minutos y a una temperatura de  $15^\circ\text{C}$ , la muestra de microalgas concentradas se colocaron en tubos eppendorf y se congelaron para su posterior análisis.

La cuantificación de las proteínas se hizo con el método de Lowry *et al.* (1951), previa extracción con NaOH 1.0 N siguiendo el método de Raush (1981).

Para la cuantificación de los carbohidratos, se hizo la extracción mediante el método de Whyte (1987), usando como agente extractor  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M, y la cuantificación se realizó por el método de Dubois *et al.* (1956).

La extracción de los lípidos se hizo por el método de Bligh y Dyer (1959) y la cuantificación según el método de Pande *et al.* (1963).

Para la cuantificación de los ácidos grasos, inicialmente se extrajeron los lípidos totales con el método de Blight y Dyer (1959). La fase lipídica se secó con nitrógeno gaseoso y se sometió a metanólisis con 5 % de HCl en metanol durante 2.5 horas en baño maría a 85 °C (Sato y Murata, 1988). La extracción de los ácidos grasos se realizó con hexano grado HPLC. La identificación y cuantificación se realizó por medio de un cromatógrafo de gases acoplado al detector de ionización electrónica GCD1800B: Para la identificación se tomaron en cuenta los tiempos de retención de cada uno de los picos presentes en el cromatograma, así como la presencia de los iones característicos de cada ácido graso que conforman el espectro de masas.

Para calcular la concentración de los ácidos grasos de *Haematococcus*, se utilizó una curva de calibración previamente preparada con una mezcla comercial de 37 ácidos grasos metilados (SUPELCO) en un intervalo de concentración de 10 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Este gradiente de concentración fue definido de acuerdo a la sensibilidad del equipo de cromatografía (GCMS-GCD1800B). Para cada pico de ácido graso de la curva de calibración, el equipo integra el área bajo la curva que en el sistema GCMS es directamente proporcional a la concentración del mismo. Mediante el software del equipo, se calcula la pendiente de la recta, que en el sistema GCMS se conoce como factor de corrección (FC), que es utilizado al momento de calcular la concentración de cada uno de los ácidos grasos presentes en las muestras de la microalga.

### **3.6 Inducción a la carotenogénesis**

Para inducir la producción de pigmentos carotenoides en *Haematococcus* sp., se realizaron dos ensayos: 1) cultivo con alta intensidad de luz y con limitación de nutrientes y 2) cultivo con alta intensidad de luz y sin limitación de nutrientes. En ambos ensayos se iniciaron cultivos con los medios MBB, MG y Plantafol con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y un tamaño de inóculo inicial de  $30,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con tres repeticiones por cada medio de cultivo.

En el primer ensayo, una vez que los cultivos alcanzaron su máximo crecimiento se procedió a la inducción a la carotenogénesis incrementando la intensidad de luz hasta  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la cual se escogió con base en estudios previos realizados en el Laboratorio de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE.

En vista de los resultados obtenidos en el primer ensayo, se realizó un segundo experimento de inducción a la carotenogénesis, en donde, una vez que los cultivos alcanzaron el máximo

crecimiento exponencial se cosecharon las microalgas por centrifugación a 2000 rpm (para remover los nutrientes remanentes), posteriormente, el paquete celular obtenido se resuspendió en 500 mL de agua destilada y las unidades experimentales fueron expuestas a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Diariamente se realizaron conteos de cada unidad experimental. Cada tratamiento constó de 3 réplicas.

Para analizar el contenido de pigmentos (clorofila *a*, *b* y carotenoides totales) en los diferentes tratamientos, desde el primer día de cultivo y cada tercer día, se colectaron volúmenes conocidos de microalgas, los cuales fueron concentrados en una centrífuga refrigerada Eppendorf (5417R) a 5500 rpm y posteriormente fueron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### 3.6.1 Extracción y análisis de pigmentos

La extracción de pigmentos carotenoides y clorofilas (*a* y *b*), se llevó a cabo por medio del método de Boussiba *et al.* (1992), modificado por Cordero *et al.* (1996) empleando dimetil sulfóxido (DMSO).

La cuantificación de pigmentos (clorofilas y carotenoides totales) se realizó por medio de métodos colorimétricos, en un espectrofotómetro HACH, DR 5000.

Para calcular la concentración de las clorofilas se utilizaron las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1979) y para los carotenoides totales se usaron las de Strickland y Parsons (1972).

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides totales} = 7.6 (A_{480} - 1.49 A_{510}) \quad (3)$$

### 3.7 Análisis estadístico

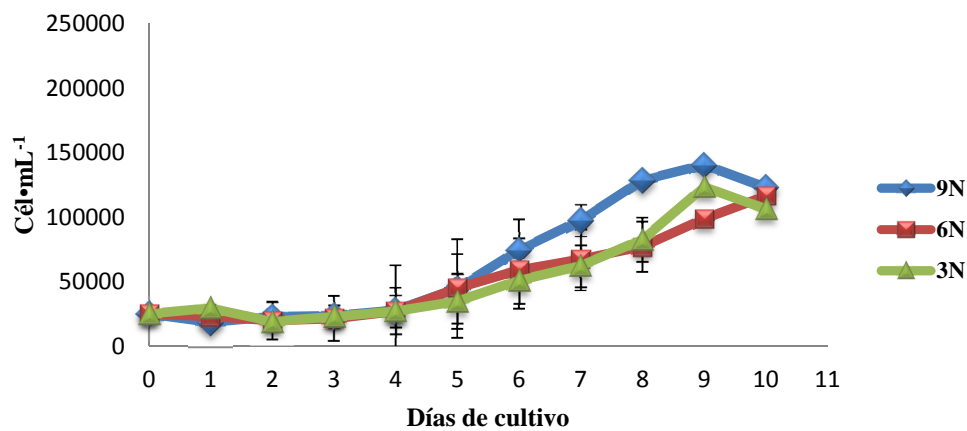
Para evaluar el efecto de los diferentes medios de cultivo e intensidades de luz sobre el crecimiento, y composición bioquímica de *Haematococcus* sp., se aplicó un diseño completamente aleatorizado (DCA) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, en los casos en los que se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), se realizó una prueba Tukey de comparación de medias. Para realizar todos los análisis se empleó el programa STATISTICA 7®

## Capítulo 4

### Resultados

#### 4.1 Obtención de biomasa y optimización del cultivo.

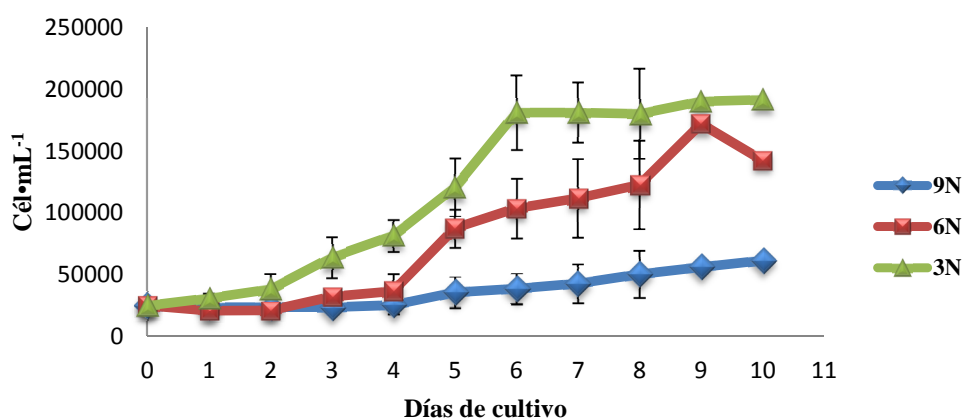
Los resultados del cultivo de *Haematococcus* sp., con el medio de cultivo Medio Basal Bold (MBB) con diferentes concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N) indican que la fase de acondicionamiento tuvo una duración de tres días para las concentraciones de 6N y 9N y de cuatro días para la de 3N, la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de un día para 3N y 6N y de dos días para 9N (Tabla 5). La densidad celular observada en el MBB fue muy similar en los diferentes tratamientos durante los primeros seis días de cultivo (Fig. 2), sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En general, las mayores biomásas para las tres concentraciones de nitrógeno estudiadas, se obtuvieron en el noveno día de cultivo, con un intervalo de 98,750 a 140,416  $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Las máximas tasas de crecimiento se obtuvieron al día cuatro con 6N y 9N ( $0.74$  y  $0.70 \cdot \text{d}^{-1}$ ) respectivamente) (Tabla 5).



**Figura 2.** Biomasa ( $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada en Medio Basal Bold, con intensidad de luz de  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).

Con respecto al cultivo con el fertilizante agrícola Miracle Gro (MG), se puede observar un patrón de crecimiento diferente entre las concentraciones de nitrógeno analizadas (Fig. 3). Según el análisis estadístico, hay una diferencia altamente significativa entre las densidades celulares de los cultivos con mayor concentración de nitrógeno (9N,  $61,340 \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y los de menores concentraciones ( $p < 0.001$ ). Los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones de 3N y

6N con densidades máximas de 190,000 y 171,875  $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Las máximas tasas de crecimiento se observaron al día dos en la concentración de 3N ( $0.74\cdot\text{d}^{-1}$ ) y día cuatro para 6N (1.25) (Tabla 5).



**Figura 3.** Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. en el medio Miracle Gro (MG), con intensidad de luz de  $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).

Tabla 5. Tasas de crecimiento ( $\mu\cdot\text{d}^{-1}$ ) de *Haematococcus* sp. cultivada con dos medios de cultivo (Medio Basal Bold, MBB y Miracle Gro, MG) con tres concentraciones de nitrógeno (3N, 6N y 9N).

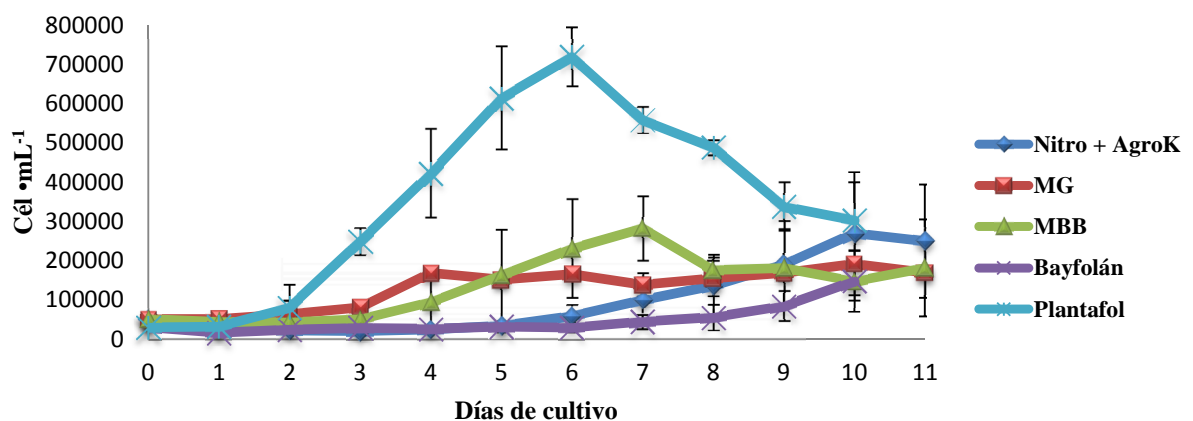
Día	MBB			Día	MG		
	3N	6N	9N		3N	6N	9N
0	0.23	-0.12	-0.45	0	0.31	-0.27	-0.09
1	-0.63	-0.23	0.31	1	0.31	0.03	0.01
2	0.28	0.13	0.05	2	0.74	0.60	-0.01
3	0.23	0.32	0.23	3	0.35	0.19	0.11
4	0.36	0.74	0.70	4	0.56	1.25	0.50
5	0.56	0.39	0.74	5	0.60	0.25	0.11
6	0.29	0.19	0.40	6	-0.00	0.11	0.14
7	0.41	0.19	0.40	7	-0.01	0.13	0.24
8	0.58	0.36	0.13	8	0.08	0.49	0.16
9	-0.22	0.23	-0.19	9	0.01	-0.27	0.12

#### 4.2. Evaluación del crecimiento de *Haematococcus* sp., con diferentes medios de cultivo e intensidades de luz.

En las figuras 4 a 6 se muestran las biomásas ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), de *Haematococcus* sp., obtenidas en este experimento.

En la intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con el fertilizante Plantafol (Fig. 4, Tabla 6), se observó una fase de acondicionamiento de un solo día. El crecimiento exponencial inició el día 2 ( $\mu=1.35\cdot\text{d}^{-1}$ ) y tuvo una duración de 3 días y la máxima biomasa se cuantificó al día 6 con una media de  $718,750 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , posteriormente se observó un decremento paulatino hasta el día 11. Con las otras dos intensidades de luz la fase exponencial tuvo una duración de 4 días. Con el medio Plantafol al sexto día se obtuvo una densidad estadísticamente superior con respecto a los otros medios evaluados ( $p<0.01$ ).

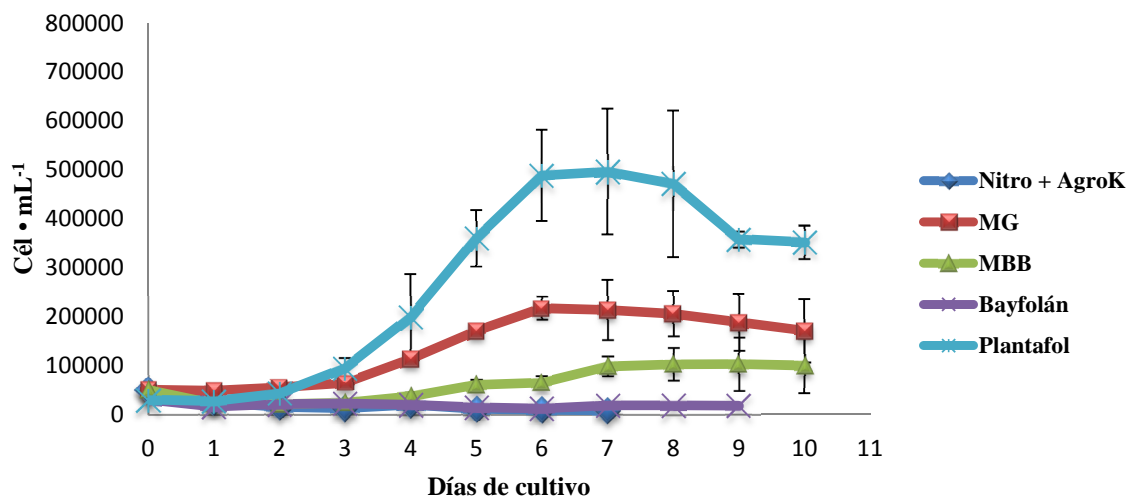
El menor crecimiento se observó con los medios NA y Bayfolán con una fase de acondicionamiento que se prolongó hasta el día 5 y 6 de cultivo respectivamente. Con el medio NA la fase exponencial tuvo una duración de dos días (días 6 y 7). En general en los medios MG y MBB, se observa una tendencia similar en el crecimiento, con densidades promedio máximas de  $191,167 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Día 10) y  $281,250 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Día 7) respectivamente, en el MBB la fase exponencial tuvo una duración de 2 días (Día 4 al 5 de cultivo).



**Figura 4:** Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con cinco medios a base de fertilizantes agrícolas (Miracle Gro, MG; Plantafol, PT; Nitrocel+agro-K, NA; Bayfolán, BF; y el control, Medio Basal Bold, MBB) y una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Cuando *Haematococcus* sp. se cultivó a una intensidad de luz de  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , los resultados indicaron que con el medio Plantafol la fase exponencial inició el día 2 de cultivo ( $\mu=0.64\cdot\text{d}^{-1}$ ) con una duración hasta el día 5 ( $\mu=0.85\cdot\text{d}^{-1}$ ) (Fig. 5, Tabla 6). La mayor densidad celular fue obtenida con este fertilizante al día seis con una media de  $488,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Con los fertilizantes Bayfolán y NA no se observó crecimiento celular y con el MBB se observó un crecimiento limitado a través del tiempo, con biomasa promedio de  $100,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  del día siete al diez, mientras que con el medio MG la máxima biomasa se obtuvo al día 6 con una media de  $216,458 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



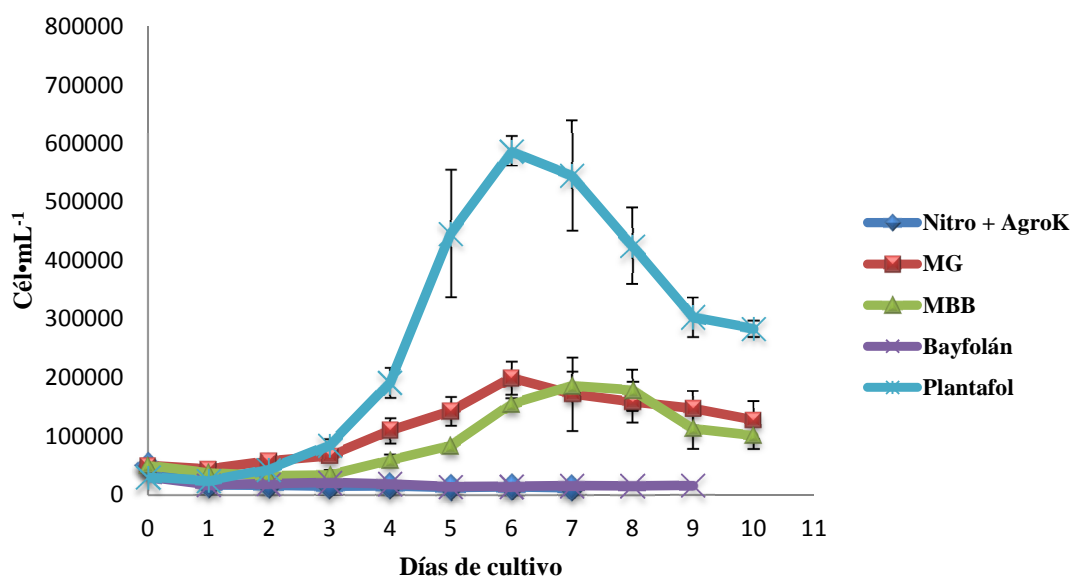
**Figura 5:** Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con cinco medios en base a fertilizantes agrícolas (Miracle Gro, MG; Plantafol, PT; Nitrocel+agro-K, NA; Bayfolán, BF; y el control, Medio Basal Bold, MBB), con intensidad de luz de  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



Con la intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , las máximas densidades se obtuvieron con el fertilizante Plantafol al día seis con una media de  $587,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Fig. 6). La fase de crecimiento exponencial inició desde el día 2 ( $\mu=0.85\cdot\text{d}^{-1}$ ) y se prolongó hasta el día 5 ( $\mu=1.22\cdot\text{d}^{-1}$ ) (Tabla 6).

Las biomásas obtenidas con los fertilizantes MG y MBB mostraron una tendencia muy similar, con densidades promedio de hasta  $199,166$  y  $185,333 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  en los días 6 y 7, respectivamente. En ambos medios la tasa de crecimiento exponencial se registró al día 4 ( $\mu=0.72\cdot\text{d}^{-1}$  y  $0.81\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Con los fertilizantes Bayfolán y NA no se observó crecimiento, con una pérdida de densidad celular a medida que avanzaban los días de cultivo.



**Figura 6:** Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con cinco medios en base a fertilizantes agrícolas (Miracle Gro, MG; Plantafol, PT; Nitrocel+agro-K, NA; Bayfolán, BF; y el control, Medio Basal Bold, MBB), con intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Tabla 6.- Tasas de crecimiento ( $\mu\cdot d^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con cinco medios en base a fertilizantes agrícolas (MG: Miracle Gro, PT: Plantafol, NA: Nitrocel+agro-K, BF: Bayfolán y el control MBB: Medio Basal Bold), en intensidades de luz de 60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Medios de cultivo	Día	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )		
		60	80	100
<b>BF</b>	1	-0.93	-0.94	-0.86
	2	0.56	0.38	0.13
	3	0.28	0.10	0.17
	4	-0.13	-0.19	-0.17
	5	0.29	-0.4	-0.4
	6	-0.1	-0.29	0.04
	7	0.59	0.59	0.12
<b>PT</b>	1	0.05	-0.14	-0.32
	2	1.35	0.64	0.85
	3	1.65	1.15	0.96
	4	0.77	1.08	1.18
	5	0.54	0.85	1.22
	6	0.23	0.44	0.40
<b>MG</b>	1	0.75	0.67	0.53
	2	0.32	0.21	0.41
	3	0.34	0.22	0.21
	4	1.07	0.82	0.72
	5	-0.15	0.59	0.38
	6	0.13	0.34	0.48
<b>NA</b>	1	-0.26	-0.30	-0.87
	2	-0.24	-0.74	-0.05
	3	-0.16	-0.27	-0.15
	4	0.35	0.67	0.03
	5	0.47	-0.83	-0.25
	6	0.79	-0.21	0.11
	7	0.77		-0.21
<b>MBB</b>	1	0.53	-0.44	0.31
	2	-0.02	-0.09	-0.20
	3	0.21	0.16	0.05
	4	0.92	0.66	0.81
	5	0.80	0.72	0.50
	6	0.51	0.10	0.89
	7	0.29	0.60	0.26

El efecto interactivo entre el medio de cultivo y la intensidad de luz muestra que se obtuvieron densidades más altas con la combinación del fertilizante Plantafol e intensidades de luz de 60 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las densidades celulares más bajas se obtuvieron con los fertilizantes agrícolas NA y BF en todas las intensidades de luz estudiadas (60,80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), mientras que con el medio control (MBB) las densidades más bajas se obtuvieron a 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración celular ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}\times 10^4$ ) de *Haematococcus* sp. cultivada con tres intensidades de luz (60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y cinco medios de cultivo (NA= Nitrocel y Agro-K, MG= Miracle Gro, MBB= Medio Basal Bold, BF=Bayfolán, PT= Plantafol). Datos correspondientes al día 6. Subíndices con letras distintas denotan diferencias significativas. Desviación estándar entre paréntesis.

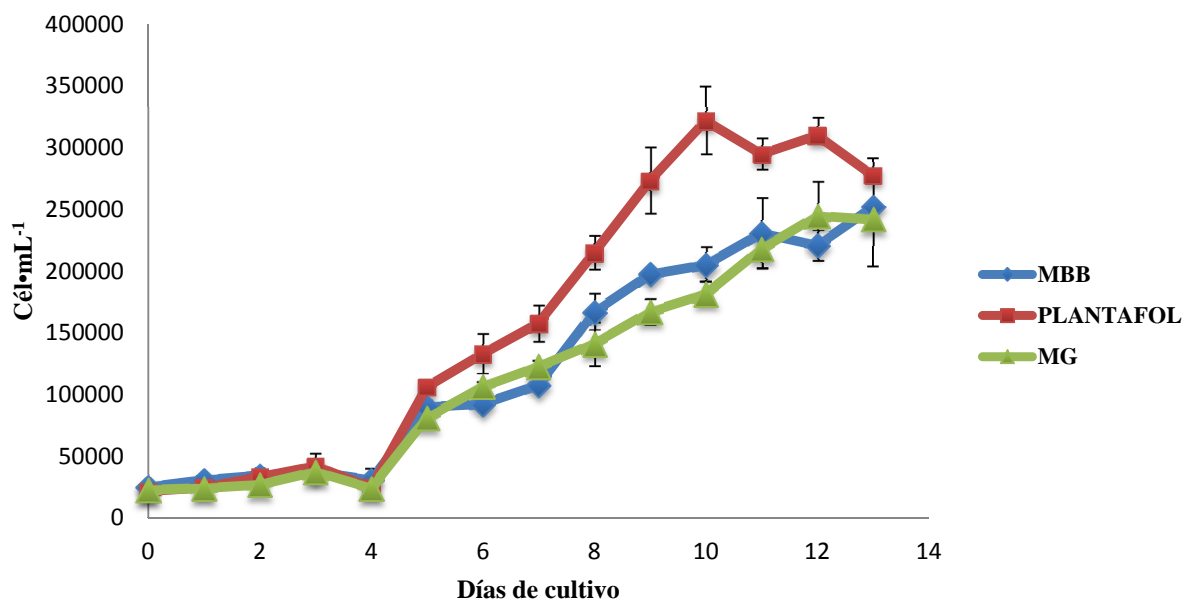
Intensidad luz	Medios de cultivo				
	NA	MG	MBB	BF	PT
60	4.2 (1.8) c, d	16.5 (1.6) c	23.0 (12.5) c	2.9 (1.1) c, d	72.0 (7.6) a
80	0.9 (0.2) d	21.7 (2.4) c	6.5 (1.3) c, d	1.2 (0.2) d	48.8 (9.3) b
100	1.1 (0.2) d	20.0 (2.8) c	15.5 (1.1) c, d	1.4 (0.3) d	58.7 (2.5) a, b

### 4.3 Evaluación de la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos totales y ácidos grasos) de la biomasa producida por *Haematococcus* sp.

#### 4.3.1 Composición proximal.

Los mejores crecimientos de *Haematococcus* sp., se obtuvieron con la intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con los medios de cultivo Plantafol y Miracle Gro, por lo que se realizó un nuevo ensayo para evaluar la composición bioquímica, utilizando estos medios e intensidad de luz y como control el MBB.

El crecimiento de *Haematococcus* sp. tuvo una fase de acondicionamiento de cuatro días con los tres medios de cultivo. La densidad máxima se obtuvo con el fertilizante Plantafol, con una media de 321,666  $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en el día diez de cultivo. El patrón de crecimiento de *Haematococcus* sp. con los diferentes medios de cultivo es similar al observado en el experimento anterior con 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figura 7: Biomasa (cél·mL<sup>-1</sup>) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada a 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en tres medios: Plantafol, Miracle Gro (MG) y el medio Basal Bold (MBB) como control.**

Los resultados de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos), se expresan como el porcentaje del peso seco total de la microalga *Haematococcus* sp. obtenida con los diferentes medios de cultivo (MBB, MG y Plantafol) (Tabla 8).

Al comparar la composición proximal entre los medios de cultivo para cada día, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los diferentes días de cultivo analizados en forma individual, el mayor contenido protéico se observó a los días 5 y 7, con valores de 11.42 a 15.46%. A partir del día 7 se observó una disminución en el porcentaje de proteínas, alcanzando el mínimo al día doce, lo que coincidió con la disminución de la densidad celular observada en la curva de crecimiento (Fig.7).

Tabla 8: Composición proximal (%) de *Haematococcus* sp. con diferentes medios de cultivo y una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Datos expresados en porcentaje en base al peso seco total. MBB=Medio Basal Bold, PT= Plantafol, MG= Miracle Gro. Subíndices con letras distintas denotan diferencias significativas. Desviación estándar entre paréntesis

Día	Proteínas			Carbohidratos			Lípidos		
	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG
	%								
<b>5</b>	12.40 <b>b</b> (0.83)	15.46 <b>a</b> (1.78)	13.49 <b>ab</b> (1.15)	45.7 <b>b</b> (3.11)	51.94 <b>ab</b> (1.46)	54.48 <b>ab</b> (5.4)	12.77 (1.68)	13.81 (2.20)	14.11 (2.17)
<b>7</b>	12.67 <b>ab</b> (0.60)	13.86 <b>ab</b> (2.08)	11.42 <b>ab</b> (0.49)	52.58 <b>ab</b> (5.1)	53.72 <b>ab</b> (3.36)	56.77 <b>ab</b> (4.87)	13.78 (0.53)	15.26 (1.37)	14.37 (0.97)
<b>10</b>	11.42 <b>bc</b> (0.24)	11.66 <b>bc</b> (0.48)	10.05 <b>bc</b> (0.17)	50.87 <b>b</b> (3.5)	67.08 <b>a</b> (4.79)	63.26 <b>ab</b> (2.45)	15.72 (0.87)	16.95 (1.0)	13.54 (1.17)
<b>12</b>	9.26 <b>c</b> (0.68)	8.60 <b>c</b> (0.96)	9.10 <b>c</b> (0.44)	52.99 <b>ab</b> (4.28)	61.59 <b>ab</b> (4.35)	57.33 <b>ab</b> (2.26)	15.68 (2.14)	13.07 (2.03)	12.99 (1.67)

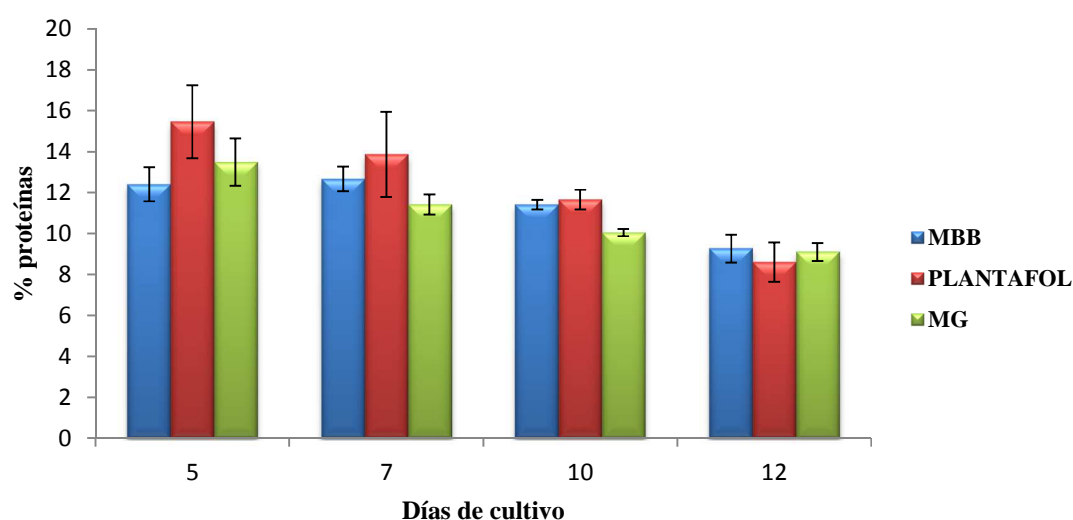
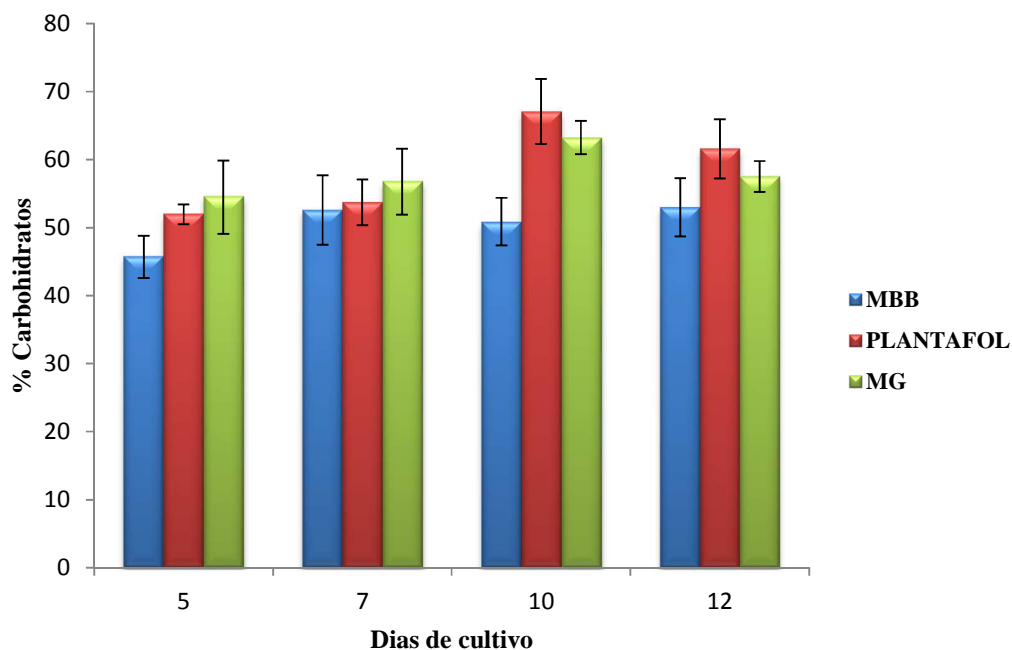


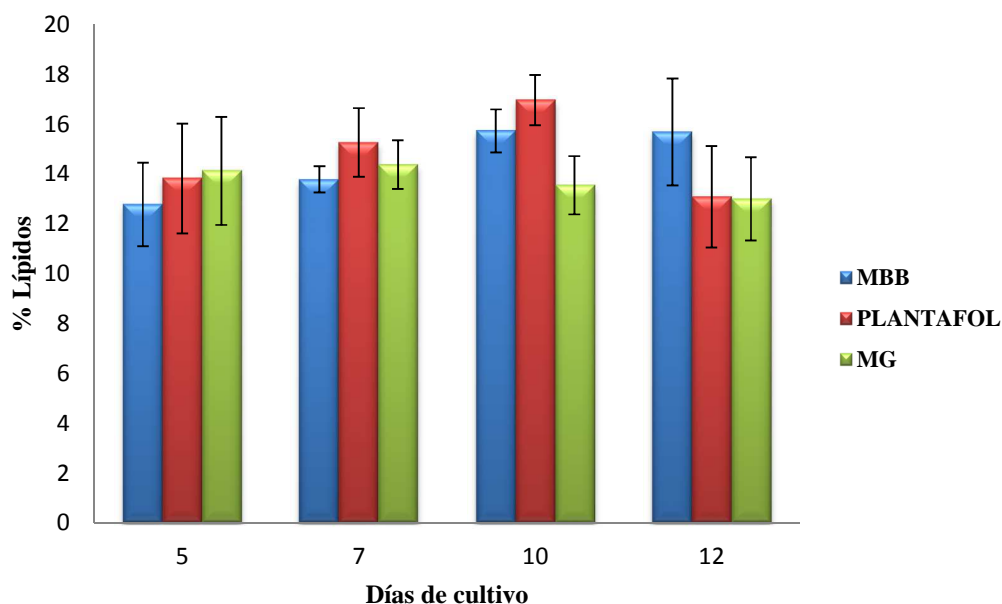
Figura 8: Porcentaje de proteínas (en base al peso seco total) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada a una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y en tres medios: Plantafol, Miracle Gro (MG) y como control el medio Basal Bold (MBB).

En relación al contenido en carbohidratos (Tabla 8, Fig. 9) en general no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre medios ni entre días de cultivo, obteniéndose porcentajes promedio de 45.7 a 67.08%, correspondiendo este último valor al décimo día de cultivo con el medio Plantafol y que resulto significativamente más alto que al inicio ( $p < 0.01$ ).



**Figura 9:** Porcentaje de carbohidratos (en base al peso seco total) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada a una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y en tres medios: Plantafol, Miracle Gro (MG) y como control el Medio Basal Bold (MBB).

Con respecto al contenido lipídico (Tabla 8, Fig. 10), no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes medios y días de cultivo ( $p > 0.05$ ), el contenido promedio fue de 12.77 a 16.95% del peso seco.



**Figura 10: Porcentaje de lípidos (en base al peso seco total) de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada a una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con tres medios: Plantafol, Miracle Gro (MG) y como control el Medio Basal Bold (MBB).**

#### 4.3.2 Composición de ácidos grasos de *Haematococcus* sp.

Se identificaron veinte ácidos grasos y el contenido se expresó como el porcentaje del peso seco total. Los ácidos grasos se agruparon en saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI) y altamente insaturados (AGAI) (Figuras 9 a 11).

El contenido de AGS constituyó entre el 23.39% y el 31.63% del total de los ácidos grasos. El AGS más abundante fue el ácido palmítico (C16:0) con valores mínimos de 17.74% para el MBB y máximos de 28.67% para el fertilizante agrícola MG, ambos valores correspondientes al día 12 de cultivo (Tabla 9).

Solo se observaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), en la sumatoria del porcentaje de AGS en el día 12 entre el fertilizante MG y el MBB.

Tabla 9: Composición de ácidos grasos saturados de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Datos expresados como porcentaje del peso seco total. Desviación estándar entre paréntesis. MBB=Medio Basal Bold, PT=Plantafol, MG= Miracle Gro. \*: Diferencias significativas.

Ácido Graso	Día											
	5			7			10			12		
	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG
<b>14:0</b>	1.78 (0.12)	1.89 (0.02)	1.63 (0.10)	1.75 (0.38)	1.85 (0.18)	1.66 (0.09)	2.04 (0.04)	1.84 (0.08)	1.64 (0.15)	2.16 (0.80)	1.91 (0.11)	1.54 (0.38)
<b>15:0</b>	0.67 (0.07)	0.68 (0.13)	0.62 (0.07)	0.71 (0.13)	0.72 (0.14)	0.73 (0.23)	0.67 (0.03)	0.64 (0.10)	0.69 (0.04)	0.98 (0.23)	0.61 (0.11)	0.60 (0.06)
<b>16:0</b>	22.57 (0.89)	20.54 (1.45)	23.00 (0.49)	21.83 (1.48)	19.91 (0.58)	22.12 (0.47)	19.63 (0.01)	22.64 (2.09)	25.19 (0.83)	17.74 (3.07)	23.02 (1.47)	28.67 (1.35)
<b>18:0</b>	1.25 (0.71)	0.99 (0.27)	1.07 (0.31)	1.05 (0.39)	1.22 (0.12)	0.64 (0.19)	1.13 (0.23)	0.79 (0.41)	0.56 (0.05)	1.51 (1.70)	0.72 (0.19)	0.81 (0.04)
<b>Σ AGS</b>	26.28 (0.45)	24.11 (0.47)	26.31 (0.24)	25.33 (0.59)	23.70 (0.25)	25.15 (0.24)	23.46 (0.08)	25.91 (0.67)	28.08 (0.27)	23.39* (1.45)	26.27 (0.47)	31.63* (0.46)

Con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), éstos representaron entre el 9.35 y el 12.71% del total de los ácidos grasos (Tabla 10), sin diferencias significativas en los porcentajes totales entre los diferentes medios ni entre los días de cultivo ( $p>0.05$ ).

Dentro de este grupo, el ácido graso más abundante fue el oleico (18:1 $\omega$ 9cis) con valores entre 5.16 y 7.16%. Los de menor abundancia fueron el 15:1 $\omega$ 5, 16:1 $\omega$ 9 y el 16:1 $\omega$ 7 con valores entre 0.71 y 1.35%.



Tabla 10: Composición de ácidos grasos monoinsaturados de la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Datos expresados como porcentaje del peso seco total. Desviación estándar entre paréntesis. MBB=Medio Basal Bold, PT= Plantafol, MG= Miracle Gro.

Ácido Graso	Día											
	5			7			10			12		
	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG
<b>15:1<math>\omega</math>5</b>	1.11 (0.03)	0.97 (0.30)	0.74 (0.03)	0.88 (0.04)	0.81 (0.05)	0.82 (0.08)	0.97 (0.09)	0.82 (0.11)	0.88 (0.06)	1.25 (0.43)	0.71 (0.07)	0.81 (0.08)
<b>16:1<math>\omega</math>9</b>	0.84 (0.07)	0.83 (0.11)	0.73 (0.05)	0.95 (0.11)	0.91 (0.12)	0.81 (0.16)	0.92 (0.05)	0.82 (0.07)	0.78 (0.20)	1.35 (0.62)	1.18 (0.17)	0.79 (0.19)
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	0.94 (0.05)	1.12 (0.12)	0.92 (0.04)	1.14 (0.08)	1.20 (0.16)	1.02 (0.14)	1.09 (0.04)	0.99 (0.25)	0.84 (0.22)	1.34 (0.63)	0.79 (0.20)	0.78 (0.11)
<b>18:1<math>\omega</math>9c+t</b>	1.57 (0.11)	1.19 (0.26)	1.49 (0.06)	1.17 (0.11)	1.04 (0.13)	1.79 (0.39)	1.04 (0.04)	1.85 (0.33)	4.16 (0.88)	1.38 (0.38)	2.15 (0.14)	4.36 (2.87)
<b>18:1<math>\omega</math>9cis</b>	5.78 (0.21)	5.76 (0.46)	5.48 (0.21)	5.71 (0.37)	5.65 (0.24)	5.16 (0.16)	5.99 (0.19)	6.81 (0.23)	5.68 (0.46)	6.04 (0.61)	7.16 (0.81)	5.97 (0.22)
<b><math>\Sigma</math> AGMI</b>	10.20 (0.09)	9.87 (0.25)	9.35 (0.08)	9.84 (0.14)	9.60 (0.14)	9.62 (0.18)	10.01 (0.08)	11.29 (0.20)	12.33 (0.36)	11.45 (0.53)	11.99 (0.28)	12.71 (0.69)

El mayor contenido de AGPI en la microalga *Haematococcus* sp. se obtuvo con el fertilizante MG, con un intervalo de 34.84% a 42.09% del peso seco en los días 5 y 12 del cultivo respectivamente (Tabla 11). El principal ácido graso de este grupo fue el ácido linoléico (18:2 $\omega$ 6-c) con porcentajes que van desde 13.06 hasta 17.39% para el cultivo con el fertilizante Plantafol, los días 5 y 12 de cultivo respectivamente. Otro ácido graso relativamente abundante en este grupo fue el 16:4 $\omega$ 3 con porcentajes que van desde el 8.12% en el medio MG el día 12 de cultivo, hasta el 13.59% en el medio Plantafol el día 7.

Con respecto a los AGAI (C18:3 $\omega$ 3, C20:4 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3), presentaron un valor mínimo de 20.82% y un máximo de 28.17%, sin diferencias significativas en los diferentes medios ( $p>0.05$ ). Se puede observar una tendencia de disminución aparente en el contenido de AGAI a medida que transcurren los días de cultivo. El ácido graso mayoritario de este subgrupo es el ácido linolénico (18:3 $\omega$ 3), con porcentajes máximos de 25.17% al día 5 de cultivo con el fertilizante MG.

Con respecto a los ácidos grasos esenciales, los ácidos araquidónico (ARA, 20:4 $\omega$ 6) y eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ 3) estuvieron presentes en menor porcentaje. El 20:4 $\omega$ 6 se encontró en un intervalo de 1.81 a 2.62%, en tanto que el 20:5 $\omega$ 3, se presentó en porcentajes ligeramente menores, con valores entre 0.94 y 2.37%, sin diferencias significativas entre los medios de cultivo ( $p>0.05$ ).

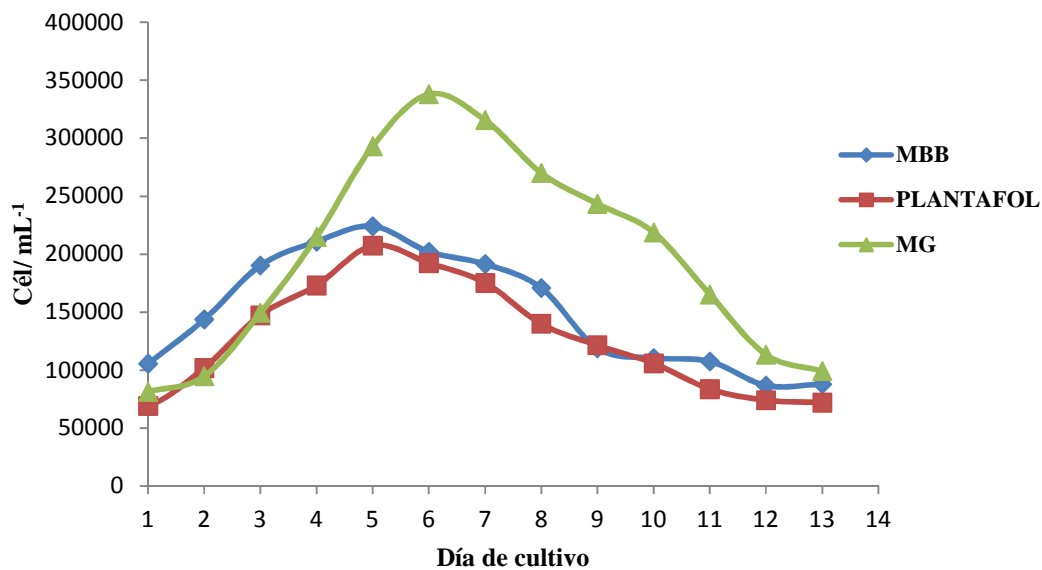
Tabla 11: Composición de ácidos grasos poliinsaturados por la microalga *Haematococcus* sp. cultivada con diferentes medios y con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Datos expresados en porcentaje en base al peso seco total. Desviación estándar entre paréntesis. MBB=Medio Basal Bold, PT= Plantafol, MG= Miracle Gro.

Ácido Graso	Día											
	5			7			10			12		
	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG	MBB	PT	MG
<b>16:2<math>\omega</math>6</b>	2.73 (0.18)	2.39 (0.57)	2.02 (0.14)	3.13 (0.32)	3.08 (0.22)	2.43 (0.17)	3.44 (0.18)	2.84 (0.32)	1.64 (0.23)	3.39 (0.16)	3.24 (0.47)	1.43 (0.19)
<b>16:3<math>\omega</math>3</b>	2.84 (0.12)	2.78 (0.05)	2.35 (0.16)	3.34 (0.13)	2.90 (0.25)	2.43 (0.13)	3.50 (0.08)	2.31 (0.23)	1.90 (0.12)	3.24 (0.15)	2.57 (0.34)	1.73 (0.06)
<b>16:3<math>\omega</math>6</b>	1.50 (0.09)	1.83 (0.24)	1.86 (0.19)	1.61 (0.07)	2.01 (0.18)	2.22 (0.01)	1.81 (0.03)	1.55 (0.50)	1.93 (0.10)	1.89 (0.82)	1.89 (0.06)	1.86 (0.12)
<b>16:4<math>\omega</math>3</b>	10.47 (0.60)	12.56 (0.85)	10.71 (0.82)	12.32 (0.34)	13.59 (0.69)	12.47 (0.59)	12.95 (0.35)	8.87 (2.27)	10.00 (0.52)	10.62 (1.73)	9.89 (0.68)	8.12 (0.60)
<b>18:2<math>\omega</math>6c</b>	15.71 (0.71)	13.06 (2.07)	14.31 (0.69)	15.10 (0.73)	14.07 (0.78)	14.27 (0.86)	15.13 (0.39)	16.94 (0.93)	15.60 (0.47)	14.95 (2.27)	17.39 (0.35)	16.29 (1.40)
<b>18:2<math>\omega</math>6t</b>	1.30 (0.86)	0.77 (0.15)	0.69 (0.05)	0.74 (0.04)	0.71 (0.02)	0.71 (0.10)	0.79 (0.01)	0.84 (0.12)	0.87 (0.11)	2.57 (2.78)	0.76 (0.08)	0.71 (0.06)
<b>18:3<math>\omega</math>6</b>	1.39 (0.03)	1.65 (0.13)	1.55 (0.04)	1.45 (0.02)	1.44 (0.13)	1.51 (0.01)	1.36 (0.05)	1.43 (0.12)	1.48 (0.03)	1.61 (0.32)	1.47 (0.09)	1.62 (0.09)
<b>18:3<math>\omega</math>3</b>	22.26 (0.71)	24.46 (1.54)	25.17 (0.90)	20.82 (1.23)	22.35 (0.62)	22.93 (0.64)	20.84 (0.42)	19.96 (1.28)	19.72 (0.79)	19.16 (2.28)	17.76 (0.41)	17.34 (1.70)
<b>18:4<math>\omega</math>3</b>	2.45 (0.22)	3.10 (0.19)	2.78 (0.12)	2.83 (0.24)	3.17 (0.07)	3.10 (0.23)	3.11 (0.08)	3.07 (0.19)	3.15 (0.27)	3.15 (0.21)	2.86 (0.19)	3.08 (0.25)
<b>20:4<math>\omega</math>6</b>	1.81 (0.15)	2.20 (0.31)	2.04 (0.14)	2.01 (0.26)	2.09 (0.07)	1.96 (0.07)	2.20 (0.10)	2.62 (0.43)	1.97 (0.10)	2.55 (0.24)	2.24 (0.06)	2.01 (0.17)
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	0.94 (0.10)	1.21 (0.13)	0.96 (0.17)	1.54 (0.78)	1.30 (0.09)	1.19 (0.12)	1.42 (0.05)	2.37 (0.59)	1.32 (0.10)	2.02 (0.61)	1.62 (0.15)	1.48 (0.19)
<b><math>\Sigma</math> AGPI</b>	38.39 (2.81)	38.14 (4.25)	36.27 (2.21)	40.52 (1.89)	40.97 (2.34)	39.14 (2.1)	42.09 (1.17)	37.85 (4.68)	36.57 (1.85)	41.42 (8.44)	40.07 (2.26)	34.84 (2.77)
<b><math>\Sigma</math> AGAI</b>	25.01 (0.96)	27.87 (1.98)	28.17 (1.21)	24.37 (2.27)	25.74 (0.78)	26.08 (0.83)	24.46 (0.57)	24.95 (2.03)	23.01 (0.99)	23.73 (3.13)	21.62 (0.62)	20.82 (2.06)
<b><math>\Sigma</math> <math>\omega</math>3</b>	38.96 (1.75)	44.11 (2.76)	41.97 (2.17)	40.85 (2.72)	43.31 (1.72)	42.12 (1.71)	41.82 (0.98)	36.58 (4.56)	36.79 (1.8)	38.19 (4.98)	34.7 (1.77)	31.75 (2.8)
<b><math>\Sigma</math> <math>\omega</math>6</b>	24.44 (2.02)	21.9 (3.47)	22.47 (1.25)	24.04 (1.44)	23.4 (1.4)	23.1 (1.22)	24.73 (0.76)	26.22 (2.42)	23.49 (1.04)	26.96 (6.59)	26.99 (1.11)	23.92 (2.03)
<b><math>\omega</math>3/<math>\omega</math>6</b>	1.59	2.01	1.87	1.70	1.85	1.82	1.69	1.39	1.57	1.42	1.28	1.33

#### 4.4 Inducción a la carotenogénesis.

##### 4.4.1 Experimento 1.- Cultivo de *Haematococcus* sp., sin reemplazo de nutrientes y con un incremento en la intensidad de luz a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a partir del día 6 de cultivo.

Para los experimentos de inducción a la carotenogénesis, inicialmente *Haematococcus* se cultivó con los medios MBB, MG y Plantafol y con una intensidad inicial de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A partir del día 6 (máxima biomasa de  $338,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  con MG), cuando se observó que ya no había un aumento en la densidad celular ( $\mu=0.21\cdot\text{d}^{-1}$ ), se incrementó la intensidad de luz hasta  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y a partir de éste día la biomasa obtenida con los tres medios de cultivo presentó un decremento paulatino hasta el día 13, cuando culminó el experimento (Fig. 11, Tabla 12).

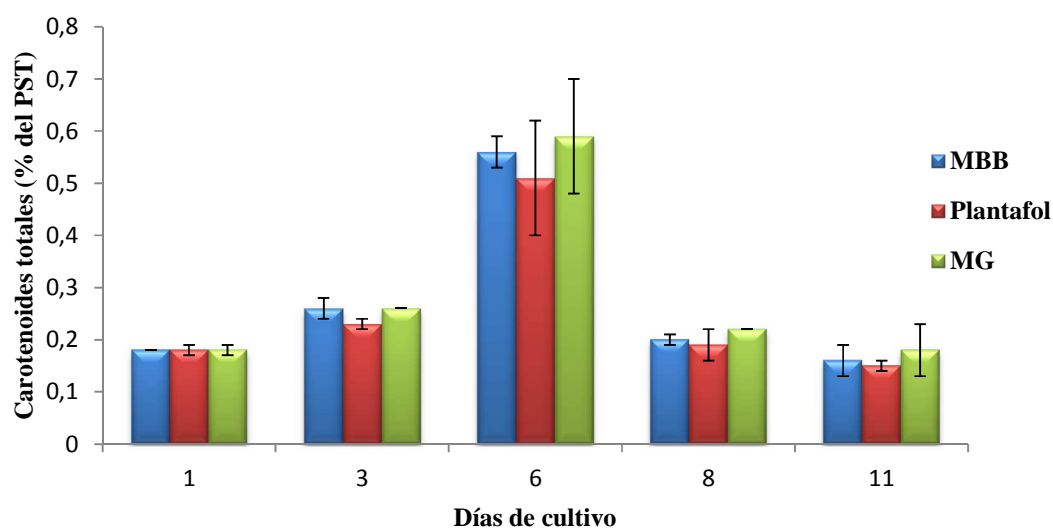


**Figura 11:** Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la microalga *Haematococcus* sp., cultivada en tres medios (Medio Basal Bold, MBB; Miracle Gro, MG; Plantafol), con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta el día 6 y un incremento posterior a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Tabla 12. Tasa de crecimiento ( $\mu \cdot d^{-1}$ ) de *Haematococcus* sp. cultivada en tres medios (Medio Basal Bold, MBB; Miracle Gro, MG; Plantafol), con una intensidad de luz de  $60 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  hasta el día 6 y un incremento posterior a  $300 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ .

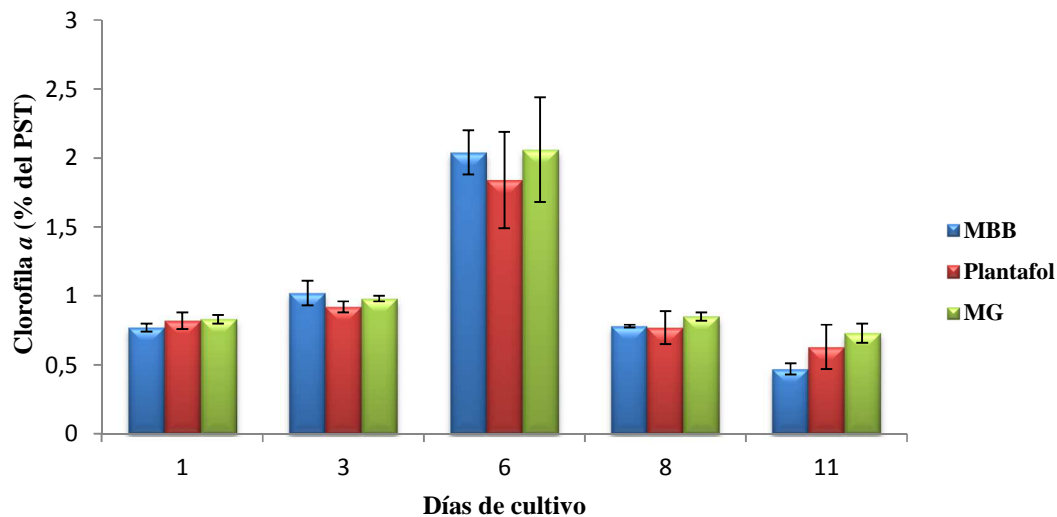
Día	Medios de cultivo		
	MBB	MG	PLANTAFOL
1	0.59	0.22	-0.02
2	0.44	0.22	0.56
3	0.40	0.66	0.53
4	0.15	0.52	0.23
5	0.09	0.45	0.26
6	-0.15	0.21	-0.11
7	-0.08	-0.10	-0.13
8	-0.16	-0.23	-0.32

El contenido total de pigmentos carotenoides en *Haematococcus* sp. cultivada con los diferentes medios de cultivo fue similar ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observaron diferencias altamente significativas entre los contenidos observados los diferentes días de cultivo ( $p < 0.001$ ) (Fig. 12). Los contenidos máximos de carotenoides totales se observaron el día 6 con los tres medios de cultivo, con un promedio de 0.55% del peso seco total, mientras que los valores mínimos corresponden al día 11 de cultivo, con promedios de 0.16%.



**Figura 12. Contenido de carotenoides totales de *Haematococcus* sp. (expresados en base al peso seco total), cultivada en el medio basal bold (MBB), Plantafol y Miracle Gro (MG), con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta el día 6 y un incremento posterior a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .**

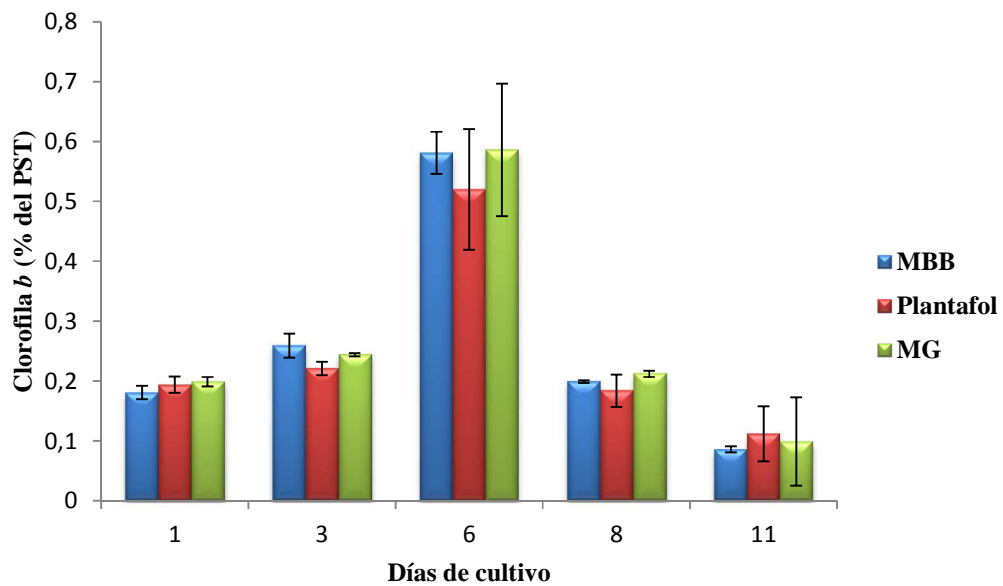
Con respecto a la clorofila *a* (Fig. 13), la tendencia indica una producción similar a la de los carotenoides totales, observándose los valores máximos el día 6 de cultivo ( $p < 0.001$ ), con un porcentaje promedio de 1.98%. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo del día 1 al 8 ( $p > 0.05$ ), sin embargo, en el día 11 las diferencias en los contenidos asociados con los medios de cultivos MBB y MG fueron muy significativas ( $p < 0.001$ ), con valores de 0.47 y 0.73% respectivamente



**Figura 13. Porcentaje de la clorofila *a* de *Haematococcus* sp., (expresada en base al peso seco total), cultivada con el Medio Basal Bold, MBB; Plantafol y Miracle Gro, MG y con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta el día 6 y un incremento posterior a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**

El pigmento minoritario de los analizados en este trabajo fue la clorofila *b* (Fig. 14). La tendencia es similar a la observada para los carotenoides y para la clorofila *a*. La mayor concentración de este pigmento corresponde al día 6 de cultivo con un promedio de 0.56%, sin diferencias significativas en los diferentes medios en este día de cultivo ( $p > 0.05$ ).

La menor concentración de clorofila *b* ( $p < 0.01$ ) corresponde al día 11 de cultivo, con valores promedio del 0.1%, sin diferencias significativas entre los diferentes medios ( $p > 0.05$ ) para este día.



**Figura 14:** Porcentaje de la clorofila *b* de *Haematococcus* sp. (expresada en base al peso seco total), cultivada con el Medio Basal Bold, MBB; Plantafol y Miracle Gro, MG, y con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta el día 6 y un incremento posterior a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

#### 4.4.2 Experimento 2.- Cultivo de *Haematococcus* sp., con reemplazo total de nutrientes y con un incremento en la intensidad de luz a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a partir del día 10.

La fase de crecimiento exponencial inició al día siguiente de la inoculación, con tasas de crecimiento de 0.60 a  $0.74 \text{ d}^{-1}$  (Tabla 13), La máxima densidad celular se observó con el medio MG al día 13, con  $534,467 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , después de este día se observaron decrementos paulatinos en los cultivos. En el día 10 de cultivo se incrementó la intensidad de luz a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y se eliminó la totalidad de los nutrientes en los tres tratamientos. (Figura 15).

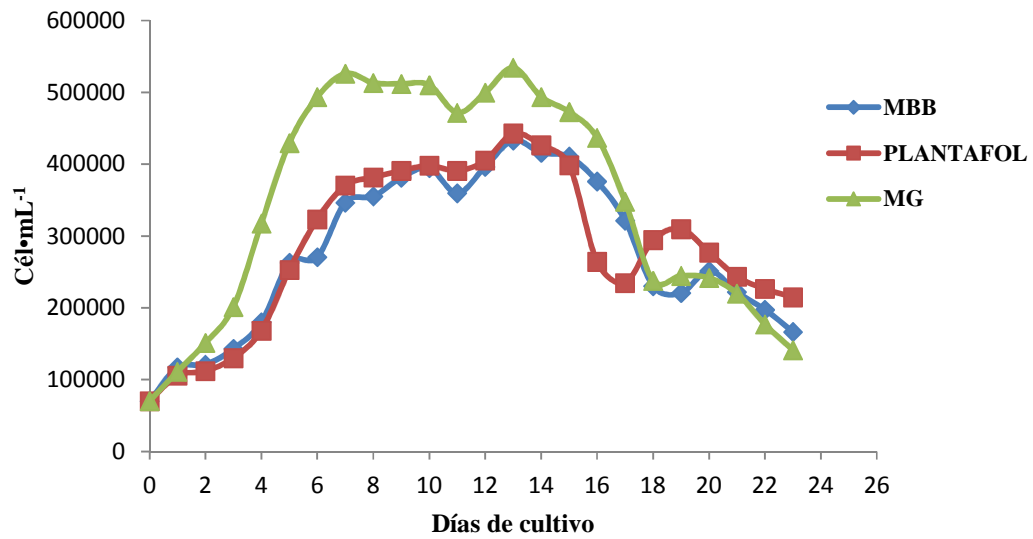
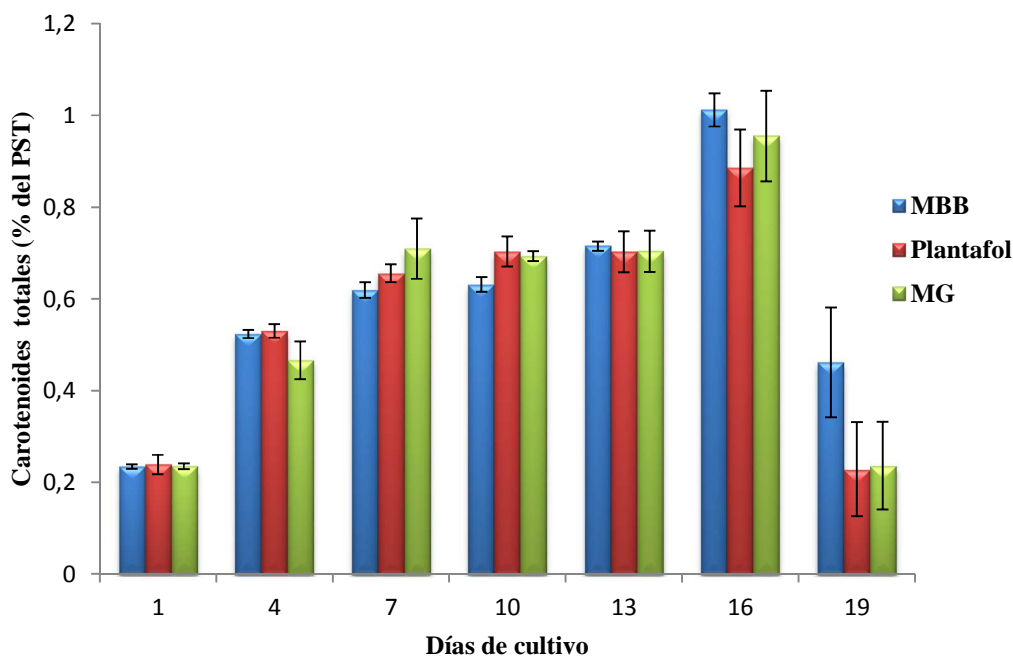


Figura 15: Biomasa ( $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de *Haematococcus* sp. cultivada con el Medio Basal Bold, MBB; Plantafol y Miracle Gro, MG y posterior eliminación de los nutrientes e incremento de la intensidad de luz a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día 9).

Tabla 13. Tasa de crecimiento ( $\mu\cdot\text{d}^{-1}$ ), de *Haematococcus* sp. cultivada con el Medio Basal Bold, MBB; Miracle Gro, MG y Plantafol, PL, hasta el día 9 y posteriormente con la eliminación de los nutrientes y con un incremento de la intensidad de luz a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Día	$\mu\cdot\text{d}^{-1}$		
	MBB	MG	PL
1	0.74	0.67	0.60
2	0.05	0.44	0.08
3	0.24	0.41	0.22
4	0.33	0.66	0.37
5	0.55	0.44	0.59
6	0.04	0.20	0.36
7	0.36	0.09	0.20
8	0.03	-0.04	0.04
9	0.10	0.00	0.03
10	0.05	0.00	0.03
11	-0.13	-0.11	-0.03
12	0.14	0.08	0.05
13	0.13	0.10	0.13
14	-0.06	-0.11	-0.05
15	-0.02	-0.06	-0.10

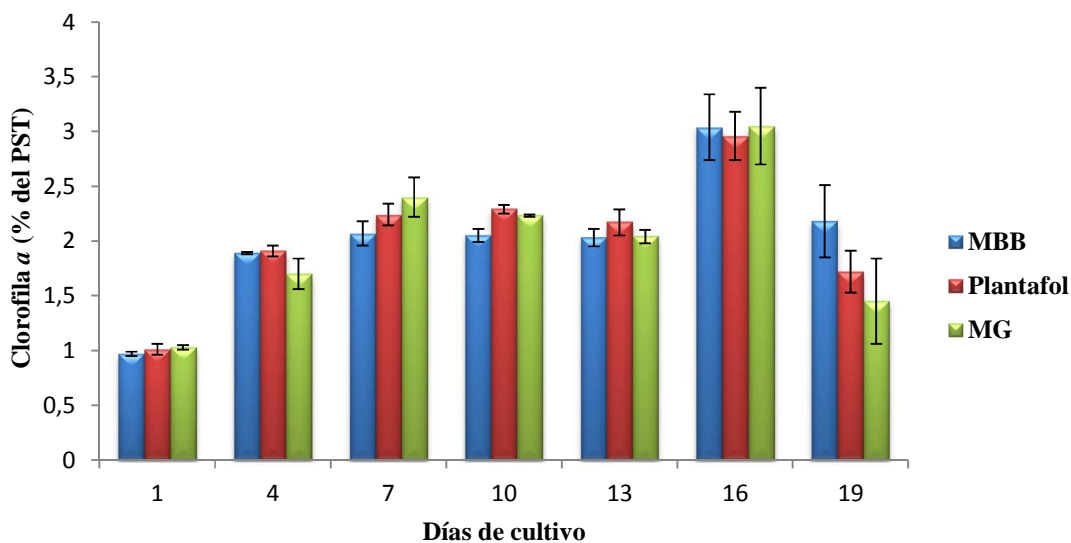
Los mayores porcentajes de carotenoides totales de *Haematococcus* sp. se observaron al día 16 de cultivo, sin diferencias significativas entre los tres medios ( $P>0.05$ ) y con valores máximos alrededor del 1.0% (Figura 16). Los valores mínimos corresponden al día 1 (0.23% en todos los medios evaluados) y 19 de cultivo (0.46 para el MBB y 0.23% para los medios Plantafol y MG).



**Figura 16. Porcentaje de carotenoides totales de *Haematococcus* sp., (expresados en base al peso seco total), cultivada con el Medio Basal Bold (MBB), Plantafol y Miracle Gro (MG), a una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.**

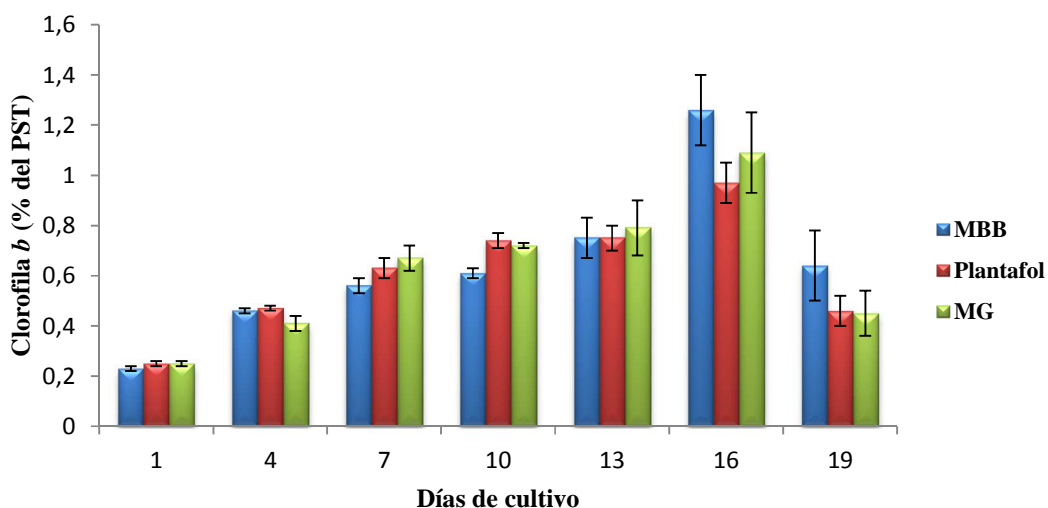
El contenido de clorofila *a* fue muy similar entre los diferentes medios de cultivo para cada día ( $p>0.05$ ) y alcanzó valores máximos el día 16 de cultivo (alrededor del 3.0% para los medios MBB, MG y Plantafol). Los valores mínimos corresponden al día 1 de cultivo, con 1%.





**Figura 17.** Concentración de clorofila *a* de *Haematococcus* sp., (expresada en base al peso seco), cultivada con el Medio Basal Bold, MBB; Plantafol y Miracle Gro, MG a una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.

En cuanto a la clorofila *b*, presenta un patrón muy similar con respecto a los otros pigmentos (Figura 18), los valores máximos se observaron el día 16 de cultivo con 0.97, 1.09 y 1.26% para los medios Plantafol, MG y MBB respectivamente y se observaron diferencias significativas entre el fertilizante Plantafol y el MBB ( $p < 0.01$ ).



**Figura 18.** Concentración de clorofila *b* de *Haematococcus* sp., (expresada en base al peso seco), cultivada con el Medio Basal Bold (MBB), Plantafol y Miracle Gro (MG), a una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con limitación de nutrientes a partir del día 9 de cultivo.

Los resultados de los ensayos de inducción a la carotenogénesis indican que el tratamiento con limitación de nutrientes produce los porcentajes más altos de carotenos (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen comparativo de la producción de pigmentos carotenoides de *Haematococcus* sp., cultivada con y sin limitación de nutrientes y con una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

<b>Medios de cultivo</b>	<b>Sin limitación de nutrientes</b>	<b>Con limitación de nutrientes</b>
	% Carotenoides	
<b>MBB</b>	0.56 (0.03)	1.01 (0.04)
<b>MG</b>	0.59 (0.11)	0.96 (0.11)
<b>Plantafol</b>	0.51 (0.11)	0.89 (0.08)

## Capítulo 5

---

### Discusión

Cuando se hace la caracterización y selección de las cepas de microalgas además del criterio fundamental de la evaluación de su cultivo en diferentes condiciones experimentales para valorar su productividad celular, se hace énfasis en el análisis de su composición bioquímica, con la intención de identificar compuestos de interés comercial y de evaluar su potencial para la producción, por lo que el aislamiento de cepas locales es ideal, pues al estar adaptadas a las condiciones de la región, pueden representar una ventaja al momento de escalar su cultivo (Farhad, 2013).

La microalga *Haematococcus* sp, que se estudió en esta tesis, fue aislada localmente, por lo que la información generada a la fecha servirá de base para futuros estudios, tendientes a su producción a escala piloto.

La microalga *Haematococcus* se ha investigado en los últimos años por su potencial como una fuente natural de pigmentos carotenoides de interés comercial, entre éstos la astaxantina, ya que las concentraciones que se han obtenido están en el orden del 1 al 3% del peso seco (Lorenz y Cysewski, 2000). Sin embargo, una de las limitantes de esta microalga son sus reducidas tasas de crecimiento y las bajas biomásas, es por ello que aún a la fecha, se siguen realizando estudios tendientes a encontrar aquellas condiciones que optimicen su cultivo y que promuevan un incremento en la producción de pigmentos carotenoides.

Entre las condiciones que se han evaluado para incrementar la producción de biomasa y la composición bioquímica de diversas microalgas están las modificaciones en el medio de cultivo, tanto las fuentes como las concentraciones de los nutrientes y para su formulación se ha tomado como base aquellos medios de cultivo mencionados ampliamente en la literatura.

Con respecto a los nutrientes mayoritarios, uno de los más estudiados en las microalgas es el nitrógeno, las investigaciones realizadas sobre la asimilación de nitrógeno por parte de las microalgas han demostrado que estas pueden crecer con nitratos, nitritos, amonio y urea, pero que las preferencias y las máximas tasas de crecimiento son, en general, similares cuando se utilizan nitratos y amonio (Syrett, 1981). Proctor (1957) indica que en condiciones de laboratorio, los nitratos pueden ser una fuente preferencial de nitrógeno en *Haematococcus pluvialis*. Levasseur et

*al.* (1993) mencionan que en última instancia, las microalgas pueden utilizar la urea, aunque en el caso de *Haematococcus* sp., no hay suficiente información sobre el efecto del amonio y la urea (Göksan *et al.*, 2011),

En este trabajo se analizó, el crecimiento de *Haematococcus* sp., cultivada con el Medio Basal Bold (MBB), el cual contiene nitratos como fuente de nitrógeno y con el fertilizante agrícola Miracle Gro (MG) cuyas fuentes de nitrógeno están en forma amoniacal y ureica. Con el MBB, los cultivos con concentraciones de nitrógeno de 3N ( $0.12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de nitrógeno), mostraron un crecimiento similar al de los cultivos con 6N ( $0.24 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y 9N ( $0.36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Borowitzka *et al.* (1991), observaron que las concentraciones de nitrógeno que mostraban mejores crecimientos en la microalga *Haematococcus pluvialis*, se encontraban en un intervalo de 0.05 a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las concentraciones que se evaluaron en esta especie estuvieron dentro de los intervalos reportados por estos autores. Orosa *et al.*, (2001) también reportan un mejor crecimiento de *Haematococcus pluvialis* cultivada con una concentración de  $0.15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ .

Cuando *Haematococcus* sp. se cultivó con una concentración de nitrógeno 9N, utilizando el fertilizante agrícola MG cuya fuente de nitrógeno es el amonio, el crecimiento fue menor, esto pudo ser debido a que el cultivo fue afectado por la alta concentración de amonio presente en el medio, ya que se obtuvieron pobres biomásas y se observó la muerte celular de *Haematococcus*, por lo que probablemente haya causado efectos de toxicidad, como se ha reportado en la microalga *Nephroselmis pyriformis* (Källqvist y Svenson, 2003).

Algunos autores han realizado estudios con otras especies de microalgas y observaron un consumo preferencial de amonio como fuente de nitrógeno, debido a un menor costo energético, por ser la fuente de nitrógeno más reducida (Mc Carthy *et al.*, 1977; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005).

El uso de fertilizantes agrícolas para el cultivo de microalgas se ha considerado como una alternativa debido a que se han obtenido buenos resultados en cultivos de diferentes especies, además el costo de los medios químicamente formulados en laboratorios es un factor limitante a la hora de producir microalgas (Valenzuela- Espinoza *et al.*, 2005; Piña *et al.*, 2007; Nieves- Soto *et al.*, 1994). Sin embargo, debe considerarse que en la formulación de los medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas, puede haber variaciones en la concentración de otros nutrientes mayores y menores, que pueden influir directamente en el crecimiento y la densidad de los cultivos.

El crecimiento de *Haematococcus* sp. con el fertilizante Miracle Gro y MBB, con concentraciones 3N, no se vio afectado, por lo que las concentraciones del resto de los nutrientes fueron toleradas por esta microalga, por lo que se podría sustituir el uso del medio MBB, ampliamente utilizado para esta microalga, con éstos fertilizantes agrícolas, igual que ha sido sugerido para otras microalgas (Valenzuela–Espinosa *et al.*, 2005; González-Muñoz., 2006; Piña *et al.*, 2007; Nieves-Soto *et al.*, 2001).

Otro factor que se debe tener en cuenta es la concentración de los metales traza, ya que diversos estudios indican *Haematococcus* spp. tolera un amplio intervalo en el contenido de hierro (0.02, 0.122 y 0.24 mg•l<sup>-1</sup>), sin que su crecimiento se vea afectado (Borowitzka *et al.*, 1991). En relación con el exceso de otros metales traza como el zinc, el cobre o el manganeso, las microalgas pueden atraparlo o pueden disminuir su biodisponibilidad al formar complejos y por tanto, limitando el crecimiento del cultivo (Cañizares- Villanueva, 2000; Robles *et al.*, 2007), sin embargo, en este estudio las concentraciones de los metales traza no estuvieron presentes a nivel tóxico, por lo que no fue una causa probable de limitación de crecimiento en el caso de los fertilizantes Bayfolán y NA.

En el bioensayo para evaluar el efecto interactivo entre el medio de cultivo y la intensidad de luz (60, 80 y 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), se obtuvieron biomásas hasta de  $720\times 10^3$  cél•mL<sup>-1</sup>, a 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con el medio Plantafol. Otros autores han obtenido en promedio densidades celulares de  $300\times 10^3$  cél•mL<sup>-1</sup> en intensidades de luz de 40 a 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en medios con fuentes de nitrógeno como NaNO<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub> (Borowitzka *et al.*, 1991; Cordero *et al.*, 1996; Calero-Estévez, 1998).

La composición proximal de *Haematococcus* con los medios de cultivo Plantafol y Miracle Gro fue similar a la obtenida con el medio control (MBB), no obstante, aunque las concentraciones y las relaciones entre nutrientes no influye en esta variable, sí tienen un efecto importante en el crecimiento, particularmente con el medio Plantafol, donde se obtuvieron las mayores biomásas. Estos resultados confirman la hipótesis de este trabajo, de que los diferentes medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas, propiciarán iguales o mejores crecimientos y composición bioquímica que el Medio Basal Bold, por lo cual se podría suplir el uso de medios convencionales utilizados para el cultivo de *Haematococcus* sp.

Entre las variables utilizadas en este trabajo para caracterizar a *Haematococcus* sp. y evaluar su potencial de cultivo, el perfil de ácidos grasos es muy útil, ya que nos podría dar información sobre

su valor nutricional o sobre la presencia de ácidos grasos con potencial para la producción de biodiesel, como ocurre con otras especies de agua dulce, entre ellas *Chlorella* sp., *Scenedesmus* y *Botryococcus braunii*, ya que en este trabajo la proporción de ácidos grasos saturados (AGS) es de hasta 31.63% del total del peso seco con el medio MG al día 12, similar a lo encontrado por Damiani *et al.* (2010), para *Haematococcus pluvialis*, en donde reportan el 27.81% de AGS en un cultivo en Medio Basal Bold. A pesar de que se ha mencionado que las microalgas productoras de altas concentraciones de AGPI son importantes para la producción de biodiesel, Farhad *et al.* (2013), mencionan que estos ácidos grasos podrían tener un efecto adverso en las propiedades del biodiesel, como estabilidad oxidativa, ya que el grado de saturación/insaturación de los ácidos grasos determina la calidad del biodiesel producido.

Será necesario seguir explorando otras condiciones de cultivo en *Hamatococcus*, como la limitación de nutrientes, otras intensidades de luz y variaciones en la temperatura, de tal manera que se encuentren aquellas que pudiesen incrementar la producción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, ya que esta microalga aparentemente no estaba totalmente limitada, ya que en *Haematococcus*, uno de los indicadores de estrés que resulta de la limitación de nutrientes (principalmente en nitrógeno), es la producción de pigmentos carotenoides. En este estudio, aparentemente la limitación a la que fue sometida esta especie no fue total, ya que la producción de carotenoides totales fue baja en comparación con los resultados reportado por diversos autores (Cifuentes *et al.*, 2003, Sommer *et al.*, 1991 y Boussiba *et al.*, 1999).

Otro posible indicador del estado fisiológico de las microalgas es la proporción Clorofila *a*/Carotenoides, cuando no hay limitación de nutrientes la proporción es aproximadamente de 4 y valores por debajo de 3 indican una reducción en el crecimiento por limitación de nutrientes (Orosa *et al.*, 2001), En este estudio, después del día 13 del cultivo se obtuvieron proporciones de 2.82 a 3.1 y en los demás días esta proporción estuvo alrededor de 4, valor que indica el buen estado nutricional de las microalgas. Cabe destacar que además del efecto de la limitación de nutrientes, su interacción con la salinidad o con una elevada intensidad de luz favorece la formación de pigmentos carotenoides (Borowitzka *et al.*, 1991).

En este estudio la mayor producción de carotenoides totales se obtuvo el día 16 de cultivo (10.2 mg/l), después de que cesara el crecimiento celular, a una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con una limitación total de nutrientes, estos datos son similares a los reportados por Calero-Estévez (1998) quien menciona que el efecto interactivo de la limitación total de nutrientes y una elevada

intensidad de luz ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), aumentó la concentración de carotenoides totales (13.28 mg/l). Cabe mencionar que durante este experimento se presentó un aumento no controlado de  $2^{\circ}\text{C}$  en la temperatura del laboratorio, este pudo ser un factor que influyó directamente en el aumento de la producción de carotenoides en *Haematococcus* sp., ya que según mencionan Borowitzka *et al.*, (1991), un aumento en la temperatura resulta en un aumento en el estrés y por tanto en un incremento de la producción de carotenoides.

Es importante destacar, que antes de la inducción al estrés, en células flageladas y palmeloides de *Haematococcus* sp., además de las concentraciones de clorofila *a* obtenidas en este trabajo (con valores máximos de 3.05 %), también se encontró el 0.71% de pigmentos carotenoides. Estudios realizados por Goodwin y Jamikorn (1954), indican que los carotenoides que están presentes en las células palmeloides son el  $\beta$ - caroteno (10-20%) y las xantofilas (75-80%), principalmente luteína, pero no se induce la síntesis de astaxantina hasta que la célula es totalmente inducida y pasa al estado de aplanospora.

Bajo las condiciones de estrés mencionadas (limitación total de nutrientes y elevada intensidad de luz), se produjo un aumento de la concentración de carotenoides totales (con valores máximos de 1.01% para el MBB). En circunstancias de estrés, la luteína (carotenoide primario más abundante en las células verdes), se reduce drásticamente (Orosa *et al.*, 2001; Boussiba *et al.*, 1991). En el estadio de aplanosporas se encuentran elevadas concentraciones de carotenoides secundarios, de los cuales un 70% son monoésteres de astaxantina, el 10% son diésteres de astaxantina, el 5% es astaxantina libre, el 15% restante corresponde a una mezcla de  $\beta$ -caroteno, cantaxantina y luteína. (Kobayashi *et al.*, 1993; Orosa *et al.*, 2001). Los carotenoides primarios producidos en el interior del cloroplasto, tienen como función específica proteger a las clorofilas y a las membranas tilacoidales del daño oxidativo, mientras que los carotenoides secundarios, producidos cuando la célula sufre cambios fisiológicos y morfológicos como resultado del estrés, son sintetizados en el citoplasma cuando los carotenoides primarios no pueden proteger el sistema fotosintético del exceso de energía (Grung *et al.*, 1992, Elliot, 1934, Hagen *et al.*, 1993)

Para incrementar la producción de carotenoides se requiere de nitrógeno y la mejor fuente son los nitratos, ya que la urea, el nitrato de amonio y el cloruro de amonio inhiben ligeramente la carotenogénesis (Borowitzka *et al.*, 1991), en este trabajo, se pudo observar que cuando

*Haematococcus* se cultivó en el Medio Basal Bold, cuya fuente de nitrógeno son los nitratos, el porcentaje de carotenoides fue ligeramente superior.

Los resultados obtenidos indican que es necesario continuar los estudios de esta especie, de tal manera que se logre optimizar la producción de biomasa y posteriormente inducir la carotenogénesis, estos aspectos son un requisito para lograr el escalamiento de su cultivo a niveles masivos



## Conclusiones.

---

- 1) La mejor concentración de nitrógeno para el cultivo de *Haematococcus* fue 3N.
- 2) Con los medios a base de fertilizantes agrícolas Plantafol (PL) y Miracle Gro (MG) se obtiene igual o mejor crecimiento algal que con el medio químicamente formulado (MBB).
- 3) A excepción del medio MG, con la intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  se obtuvieron las más altas densidades celulares.
- 4) En general la composición bioquímica de *Haematococcus* fue similar entre los medios a base de fertilizantes agrícolas y el medio control MBB.
- 5) La alta concentración de ácidos grasos saturados de la microalga *Haematococcus* sp. la convierten en una buena candidata para ser usada como biocombustible siempre y cuando se consiga optimizar el cultivo y generar mayor biomasa.
- 6) El efecto interactivo de la inducción con la alta intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y limitación completa de nutrientes aumenta la producción de carotenoides totales.

## Referencias bibliográficas.

---

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. 1995. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. Universidad da Coruña, Monografías. 26, 210 pp.
- Barsanti, L y Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Taylor y Francis Group. Baton Rouge. 291pp.
- Ben-Amotz, A. y Avron, N. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 95–119 p.
- Bligh, E. G. y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917 p.
- Borowitzka, L.J y, Borowitzka, M.A. 1989.  $\beta$ -Carotene (Provitamin A) production with algae. En: Vandamme E.J. (ed.), *biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science, London, 15-26 p.
- Borowitzka, M.A., Huisman, J.M. y Osborn, A. 1991. Culture of astaxanthin- producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology.* 3: 295-304 p.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology.* 7: 3-15 p.
- Boussiba, S. y Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant. Cell Physiol.* 32(7): 1077-1082 p.
- Boussiba, S., Fan, L. y Vonshak, A. 1992. Enhancement and determination of astaxanthin. Accumulation in green algae *Haematococcus pluvialis*. *Methods in Enzymology.* 213: 386-391p.
- Boussiba, S., Wang, B., Yuan, P.P., Zarka, A. y Chen, F. 1999. Changes in pigments profile in the green algae *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett.* 21: 601-604 p.
- Brinda, B.R., Sarada, R., Sandesh – Kamath, B. y Ravishankar, G.A. 2004. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*—cultural and regulatory aspects. *Current Science.* 87 (9).

- Calero-Estévez, A. B. 1998. Optimización del cultivo y de la inducción a la carotenogénesis de la microalga *Haematococcus* sp. Tesis Maestría. CICESE. Baja California, México.
- Caswell, M. y Zilberman, D. 2000. Algalculture. Economic Research Service, United States Department of Agriculture. Recuperado el 17 de Octubre del 2013, de <http://oregonstate.edu/dept/iifet/2000/papers/zilberman.pdf>
- Cañizares-Villanueva, R.O. 2000. Bioabsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista latinoamericana de microbiología. 42: 131-143
- Cerón, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernández, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G., Molina, E. 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. Appl. Microb. Cell Physiol. 74, 1112–1119 p.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, R. Z. y Flores-Cotera, B, L. 2010. Una Vista Integral de la Síntesis de Astaxantina en *Phaffia rhodozyma*. BioTecnología, 14 (3): 24-38 p
- Chisti, Y. 2006. Microalgae as sustainable cell factories. Environmental Engineering and Management J. 5 (3): 261-274 p.
- Cifuentes, A. S., González, A. M., Vargas, S., Hoeneisen, M y 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 p.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B.O. y Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. Biotechnology letters. 18(2): 213-218 p.
- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D. y Leonardi, P.I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as biodiesel feedstock. Bioresource Technology. 101: 3801-3807 p.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G. y Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture. 200: 129–146 p.
- Domínguez, A., Fábregas, J., Otero, A. 2006. Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Algas. Volumen Junio: 4-9 p.

- Domínguez-Bocanegra, A.R., Ponce-Noyola, T. y Torres-Muñoz, J.A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:783–791 p.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.D., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry.* 28: 350-356 p.
- Duk, K.C., Suk, L.J., Hyun, P.T. y Jun, S.S. 2006a. Productive encystment of *Haematococcus pluvialis* by controlling a specific irradiation rate in a photoautotrophic induction system for astaxanthin production. *Biochemical Engineering Journal* 12(5): 745- 748 p.
- Duk, K.C., Young, A.J., Hyun, P.T. y Jun, S.S. 2006b. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal.* 31: 234-238 p.
- Elliott, A. 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Arch. Protistenk.* 82: 250- 271 p.
- Fábregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. y Otero, A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 530- 535 p.
- Farhad, T.A., Kaveh, M.S., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Hadavand, H.M, Mirzajanzadeh, M., Malekzadeh S.S. y Bakhtiari, S. 2013. Fatty acids profiling. A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, 2: 258–267 p.
- Galvão, R.M., Santana T.S., Fontes y Sales E. A. 2013. Modeling of Biomass Production of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Mathematics*, 4, 50-56 p.
- Göksan, T., Ak. I. y Kılıç, 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: 377-383.
- Goodwin, T.W. y Jamikorn, M. 1954 Studies in Carotenogenesis 11. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem J.* 57: 376–381 p.
- González-Muñoz, J. 2006. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 63 pp.

- Gouveia, L. 2011. Microalgae as a feedstock for biofuels, Springer briefs in microbiology. Primera edición. Springer. 68 p. doi: 10.1007/978-3-642-17997-6.
- Grung, M., D'S'ouza, F.M.L., Borowitzka, M. y Liaaen-Jensen, S., 1992. J. Appl. Phycol. 4: 165-171 p.
- Guerin, M., Huntley, M.E. y Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol. 21 (5): 210-216 p.
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. 2012. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado de, <http://www.algaebase.org>; searched on 06 August .
- Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C. y Hasan, M.R. 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. 1034. Rome, 33 p.
- Hagen, C., Braune, W. y Greulich, F. 1993. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* Rostafiski (Volvocales). IV. Protection from photodynamic damage. Photochem. Photobiol. 20:153-160
- Hagen, C., Siegmund, S. y Braune, W. 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. European Journal of Phycology, 37(2): 217-226 p.
- Haker, M., Tsavalos, A.J. y Young, A.J. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 55: 207-214 p.
- Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J. y Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. Aquac. Enging. 10 (2): 99- 110 p.
- Jeffrey, S.W y Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. Biochimie and Physiology Pflanze. 167: 191-194 p.
- Källqvist, T. y A. Svenson. 2003. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. Water Research, 37: 477-484 p.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. Applied and Environmental Microbiology. 59(3): 867-873 p.

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. y Nagai, S. 1992. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of fermentation and bioengineering*. 79 (1): 61-63 p.
- Levasseur, M.P., Thomson, A. y Harrison, P.J. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of Phycology*. 29: 587-595 p. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00587.x
- Lorenz, R.T y Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech*, 18: 160-167 p.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J., Farr, A.L., y Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193: 265-275 p.
- Lu, F., Vonshak, A. y Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on Groth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of phycology*. 30:829-833 p.
- McCarthy, J., Nevins, J.L. (1986). Utilization of nitrogen and phosphorus by primary producers in warm- core ring 82-B following deep convective mixing. *Deep Sea Res*. 33: 1773-1788 p.
- Metting, B. y Pyne, W. J. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 386-394 p.
- Misawa, N. 2011. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 1-7 p.
- Nieves-Soto, M., Cortes-Altamirano, R., Gutiérrez-Corona, C.G. y Pacheco-Marges, Ma. del R. 1994. Producción de fitoplancton a bajo costo. 1. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp. (Chlorophyceae), en un sistema estático en medio "F" y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. *An.Inst. Ciencias del Mar y Limnol*. 21(1-2):119-127 p.
- Nieves-Soto, M., Piña, P., Voltolina, D., Cordero, B. y López, J.A. 2001. Informe técnico final al laboratorio de Maricultura del Pacífico del proyecto SIMAC No. 980106076: Evaluación de los Sistemas de Producción de Microalgas en Laboratorios Comerciales de Larvas de Camarón. Universidad Autónoma de Sinaloa. 50pp
- Ortega, A.O. Cultivo y composición bioquímica de microalgas marinas. Informe de estancia en investigación científica. Centro de Investigación Científica y de Educación superior de Ensenada. 46 p.

- Ortega-Acosta, O. 2011. Evaluación del cultivo semicontinuo de microalgas marinas. Tesis de licenciatura. Universidad de Occidente. Guasave, Sinaloa, México
- Pacheco, J.M. 2003. Evaluación del valor nutrimental de la microalga *chaetoceros muelleri* cultivada en un medio no convencional, para alimentar a larvas de camarón blanco *litopenaeus vannamei*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 85 p.
- Pande, S.V., Parvin, R.K., Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6: 415-423 p.
- Piña, P., Medina, M.A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J.A., Guerrero, M.A. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Revista de Investigación Marina*. 28(3):225-236 p.
- Proctor, V.W. 1957. Preferential assimilation of nitrate iron by *Haematococcus pluvialis*. *Am.J. Bot.* 44:141-143p.
- Pulz, O. y Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 635- 648 p.
- Qiu, B. y Li, Y. 2006. Photosynthetic acclimation and photoprotective mechanism of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) during the accumulation of secondary carotenoids at elevated irradiation. *Phycologia*. 45(2): 117- 126 p.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. y Rengasamy, R. 2007. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 517–523p.
- Raush, T. 1981. The stimulation of microalgal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiología*. 78: 237-251 p.
- Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, Oxford. 566 p.
- Robles, K., López, J.A., Martínez, L.R. y Serna, M. 2007. Evaluación del efecto de la concentración de hierro en el crecimiento y tamaño celular de *Chaetoceros muelleri* cultivada en laboratorio. *Rev. Invest. Mar.* 28(1): 63-70 p.
- Saracco, M. del R. 2003. Cultivo y composición proximal de la microalga *Nannochloropsis oculata* bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de Licenciatura.

- Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.  
46 p.
- Sato, N. y Murata, N. 1988. Membrane Lipids. *Methods in Enzimology*. 167: 251-259 p.
- Sommer, T.R., Potts, W.T. y Morrissy, N.M. 1991. Utilisation of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 94: 79-88 p.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. y Isambert, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101 (2): 87- 96 p.
- Strickland, J.D y Parsons, T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigment analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. *Fish resource Building Canada Bulletin*. 167: 313-328 p.
- Syrett, P.J. 1962. Nitrogen assimilation. En: Lewin R.A. (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, London. 171-188 p.
- Syrett. P.J 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: Platt, T. (Ed). *Physiological bases of phytoplankton ecology*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 346 p.
- Valenzuela-Espinoza, E., Lafarga-De la Cruz, F., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. 2005. Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31(1A): 79–89 p.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of Phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241 p.