

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

**Evaluación de medios de cultivo alternativos para la producción de biomasa de
*Haematococcus pluvialis***

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

SHARON CAROLINA VILLAMARÍN HIDALGO

Quito, 2023

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología de la Srta. Sharon Carolina Villamarín Hidalgo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

PhD. Diana Astorga García

Directora de la Disertación

Quito, 23 de diciembre de 2022

DEDICATORIA

A mis abuelitos, Jorge y Yolanda, que me impulsaron y me aconsejaron que la educación es lo primordial y el camino hacia un mejor futuro. Siempre los tendré presentes en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Dios, el cielo y el mar son pequeños ante el inmenso agradecimiento que te tengo por permitirme culminar un logro más en mi vida. Me has brindado tu ayuda en momentos difíciles y he aprendido de ellos. Gracias a ti esta meta está cumplida. A mis padres y familia: gracias por su apoyo incondicional, el amor, el esfuerzo y el sacrificio que han hecho por mí. Sin duda, esto es por ustedes.

Mi agradecimiento, también, va dirigido a mi directora, la PhD. Diana Astorga. Gracias por sus consejos, apoyo y guía para culminar mi tesis de la mejor manera. Un agradecimiento sentido para mis docentes, que estuvieron pendientes de mí durante este proceso. A Kelly López, por brindarme su tiempo y espacio para poder realizar la parte experimental de mi proyecto y a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en sí, por permitirme estudiar la carrera de mis sueños y hacer de mí una profesional de calidad.

Por último, y no menos importante, agradezco a mis amigos, parte fundamental en todo este proceso. Les extiendo un gracias por apoyarme, ayudarme y darme consejos que, aunque no lo crean, me ayudaban mucho para seguir adelante. Ustedes hicieron que disfrute cada momento porque siempre estuvieron ahí hasta la culminación de mi tesis. Los llevaré en mi corazón.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 OBJETIVOS	5
3.1.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
5. RESULTADOS	8
5.1. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE <i>Haematococcus pluvialis</i> SOMETIDO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SIN AIREACIÓN	8
5.2 INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE <i>Haematococcus pluvialis</i> SOMETIDO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS BAJO AIREACIÓN	15
6. DISCUSIÓN.....	18
a. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS PARÁMETROS DE CULTIVO CONTROLADOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>Haematococcus pluvialis</i> A ESCALA LABORATORIO	18
b. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>Haematococcus pluvialis</i> A ESCALA LABORATORIO	21
7. CONCLUSIONES	25
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Montaje del experimento sin aireación con sus tres réplicas respectivas antes de ser inoculado y después de la inoculación de la microalga.....	7
Figura 2. Densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados sin aireación.....	10
Figura 3. Contaminación registrada en el medio Extracto de Rosas (ER).	13
Figura 4. Diámetro celular de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> en los tratamientos sin aireación.....	14
Figura 5. Densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados con aireación.....	16
Figura 6. Tamaño celular de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> en los diferentes tratamientos ensayados con aireación.....	17

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados sin aireación.	11
Tabla 2. Diámetro celular de <i>Haematococcus pluvialis</i> sometido a los diferentes tratamientos sin aireación.	12
Tabla 3. Densidad celular obtenida en los diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación empleados bajo régimen de aireación constante.	15
Tabla 4. Diámetro celular obtenido en los diferentes tratamientos ensayados con aireación.	17

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del fertilizante Fuerza Verde (500 g) (Edifarm, s.f.).....	35
Anexo 2. Porcentaje promedio de los componentes del Extracto de Rosas (De Lima et al., 2019).....	35
Anexo 3. Composición del medio M1B5 (1 L).....	35
Anexo 4. Rango promedio de los tratamientos sin aireación en el día 8.	36
Anexo 5. Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo sin aireación en la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> en el día 8 de experimentación.	36
Anexo 6. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> entre los medios de cultivo sin aireación en el día 8 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.....	37
Anexo 7. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> entre los medios de cultivo sin aireación en el día 8 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.....	37
Anexo 8. Rango promedio de los tratamientos sin aireación en el día 19.	38
Anexo 9. Prueba no paramétrica de del efecto de los medios de cultivo sin aireación en la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> en el día 19 de experimentación.....	38
Anexo 10. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> entre los medios de cultivo sin aireación en el día 19 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.....	39
Anexo 11. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> entre los medios de cultivo sin aireación en el día 19 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.....	39
Anexo 12. Rango promedio de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación.....	40
Anexo 13. Prueba no paramétrica de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación.	40
Anexo 14. Comparación de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.	40

Anexo 15. Comparación de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis representado en un gráfico de cajas y bigotes.....	41
Anexo 16. Referencia de la medida del diámetro de la microalga <i>H. pluviialis</i>	41
Anexo 17. Rango promedio de los tratamientos con aireación en el día 11	41
Anexo 18. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo con aireación en la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> en el día 11 de experimentación.....	42
Anexo 19. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> entre los medios de cultivo con aireación en el día 11 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.....	42
Anexo 20. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> entre los medios de cultivo con aireación en el día 11 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.....	42
Anexo 21. Rango promedio de los tratamientos con aireación en el día 14.	43
Anexo 22. Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo con aireación en la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> en el día 14 de experimentación.....	43
Anexo 23. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> entre los medios de cultivo con aireación en el día 14 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.....	43
Anexo 24. Comparación de la densidad celular de la microalga <i>Haematococcus pluviialis</i> entre los medios de cultivo con aireación en el día 14 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.....	44
Anexo 25. Rango promedio de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos con aireación.....	44
Anexo 26. Prueba no paramétrica de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos con aireación.	44

1. RESUMEN

Haematococcus pluvialis es una microalga verde unicelular, con forma elipsoide y mótil durante su fase verde. En condiciones de estrés (fase roja), pierde su movilidad, las células se enquistan y producen el ketocarotenoide conocido como astaxantina. Debido a la importancia económica de este metabolito, el complejo ciclo de vida algal y su lento crecimiento, se emplean equipos y medios de cultivo costosos para favorecer la producción de biomasa. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar medios de cultivo alternativos para la maximización de la biomasa en la fase verde de esta microalga, así como optimizar las condiciones de su cultivo a escala laboratorio. Se examinaron dos medios de cultivo alternativos, Extracto de Rosas y Fuerza Verde, y se los comparó con el medio comercial (M1B5). En la búsqueda de la optimización de las condiciones de cultivo, bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y temperatura ambiente, se analizaron dos fuentes de luz, luz solar y luz LED ($75 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se revisó la importancia de la presencia o ausencia de aireación. El fertilizante Fuerza Verde resultó un medio económico y efectivo para el cultivo de la fase verde de *H. pluvialis*: permitió alcanzar mayor tamaño celular, alargó la fase de crecimiento exponencial y culminó con el mismo rendimiento que el medio comercial en menor tiempo, además de proporcionar nutrientes adicionales. El Extracto de Rosas, por el contrario, no fue recomendable. Adicionalmente, la luz solar propició un mejor crecimiento de *H. pluvialis* que la luz blanca, tanto en condiciones de aireación como en su ausencia. No obstante, Fuerza Verde permaneció como excelente opción al medio comercial si la fuente de luz disponible fue LED. Finalmente, la aireación para *H. pluvialis* mótil es un factor predisponente para el mejor aprovechamiento de los nutrientes independientemente del medio de cultivo empleado. En resumen, puede afirmarse que Fuerza Verde es una alternativa accesible, menos costosa y muy efectiva para el cultivo de *H. pluvialis* a escala de laboratorio, especialmente si se usan luz solar y aireación para maximizar la biomasa monoalgal y minimizar la contaminación.

Palabras clave: biomasa, condiciones de incubación, fertilizante agrícola, fase verde, *Haematococcus pluvialis*.

2. ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is a unicellular, ellipsoid, green microalga which is motile during its green phase. Under stress conditions (red phase), cells become immobile, encyst, and produce the ketocarotenoid astaxanthin. Given the importance of this metabolite, the complex life cycle of the microalga and its slow growth, expensive equipment and culture media are used in order to produce biomass. Therefore, the objective of the present study was to evaluate alternative culture media for the maximization of microalgae biomass in *H. pluvialis* green phase, as well as the optimization of laboratory culture conditions. Fuerza Verde and Roses Extract we examined as alternative media and compared with the commercial medium (M1B5). In search for optimal culture conditions, under photoperiod 12-12 and ambient temperature, two sources of light were analyzed, sunlight and LED light ($75 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and the effect of presence or absence of aeration was established. The fertilizer Fuerza Verde stood up as a cheap and effective medium for the culture of the green phase of *H. pluvialis*: it enabled to reach larger cell size, extended exponential growth phase y obtained the same performance as the commercial medium in less time. Besides, it provided additional nutrients. On the contrary, Roses Extract was not advisable. Additionally, sunlight resulted in better growth than white light, in the presence or absence of aeration. Nevertheless, Fuerza Verde remained as an excellent medium option when only LED light was available. Finally, aeration for the motile phase of *H. pluvialis* was a predisposing factor for the best harnessing of nutrients independently of the culture medium. In summary, it can be affirmed that the fertilizer Fuerza Verde as alternative médium is highly available, less expensive and effective for the culture of the green phase of *H. pluvialis* at laboratory scale, especially if sunlight and aeration are used for the maximization of monalgal biomass and the minimization of culture contamination.

Key words: biomass, fertilizer, green phase, *Haematococcus pluvialis*, incubation conditions.

3. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que habitan en diversos ambientes, especialmente en ecosistemas acuáticos. Estos microorganismos tienen un crecimiento rápido, sin embargo, en cultivo en laboratorio su rendimiento disminuye (Khan, Shin y Kim, 2018). El crecimiento algal consta de cuatro fases: adaptación, exponencial, estacionaria y terminal (Dutton, 2020).

Las microalgas han sido utilizadas ampliamente por sus diversas aplicaciones, especialmente por los metabolitos que generan (principalmente pigmentos, antioxidantes y ácidos grasos) (Camacho y Castillo, 2020). Entre las microalgas de interés comercial sobresale *Haematococcus pluvialis*, debido a que es uno de los mayores productores de astaxantina, con más de 40 gramos de pigmento a partir de un kilo de biomasa seca (Hernández, Pérez, Jáuregui, Alcántara y Hurtado, 2015; Sánchez, 2019).

H. pluvialis es una microalga verde unicelular, con forma elipsoide y/o redondeada, con dos flagelos en su estado vegetativo (fase verde). En condiciones de estrés (fase roja), pierde su movilidad, las células se enquistan y, a la vez, producen el ketocarotenoide conocido como astaxantina, para proteger el interior celular (Hernández et al., 2015). Existe interés biotecnológico en producir este pigmento de color rojo intenso, especialmente por sus beneficios en la salud, las industrias cosmética y farmacéutica, la acuicultura y el consumo de productos de origen orgánico para personas y animales (Borowitzka, 2013; Cruz, 2017).

Con estos beneficios en mente y las perspectivas a futuro, se ha visto la necesidad de producir biomasa de *H. pluvialis* en grandes volúmenes (Gómez, Inostroza, Pizarro y Pérez, 2013), pues es la fuente principal de este pigmento (Sánchez, 2019). Para la producción algal, se han empleado medios como Bold Basal Modificado (BBM), Optimal *Haematococcus* Medium (OHM), Rudic's Medium (RM), M1B5 y BG11, seleccionados mediante un análisis multicriterio en la literatura (Niño, Rodríguez, Díaz y Lancheros, 2017).

Los costos de producción de la biomasa estimados son elevados: 1 kg ronda los 1000 dólares (Cruz, 2017). Debido a esto, es conveniente optar por nuevas metodologías que

permitan obtener biomasa más económica (Hernández et al., 2015; Misohi, 2016). Por ejemplo, un estudio en Venezuela empleó fertilizantes agrícolas como fuente de nutrientes para producir biomasa y pigmentos y determinó que el cultivo de *Hyaloraphidium contortum* generaba mayor producción de carotenoides totales al cultivarse con fertilizante Nitrofoska. Se han llegado a obtener promedios de 3.91 ± 0.64 μg totales/mL a los 24 días de siembra: una producción de pigmentos fotosintéticos mucho mayor a la obtenida en otros medios tradicionales (Brito, Caña, Guevara, Subero y Colivet, 2016; Jannel, Caro, Bermudes y Petit, 2020).

En ese aspecto, surgen fertilizantes agrícolas comerciales como Fuerza Verde (FV), que tiene un alto contenido de macro y micro nutrientes (Edifarm, s.f.); y Extracto de Rosas (ER), que es rico en vitaminas, carbohidratos, fibra y pequeñas cantidades de cenizas (De Lima, Rodrigues de Oliveira, Lidório, Farias y Martins, 2019). Estos ecofertilizantes podrían servir como fuente de nutrientes alternativa para producir biomasa algal a menor costo.

Hanan, Al-Shorgani, Shukor, Rahman y Kalil (2013) mencionan que la producción de biomasa está influenciada por varios factores a considerar como el pH, la temperatura y la luz, de manera que se los puede manipular y estandarizar a las condiciones óptimas de la microalga (Pereira y Otero, 2020). De acuerdo al ambiente en que se las cultive, deben tomarse en cuenta variables como la altitud, la humedad y la irradiación natural, por ejemplo, si se quieren examinar, también, condiciones control (sin manipular) (Dhakal, Lama, Shrestha, Bahadur y Mani, 2014; Rost, Perales, Carstens y Pérez, 2017). Otros apuntan, además, a concentración de CO₂, aireación, luz, ciclos luz/oscuridad, agitación y deficiencia de nitrógeno (Camacho, Lancheros y Huerfano, 2016). Por ello, resulta crítico no sólo mejorar la composición de los medios de cultivo, sino también el régimen de luz para la producción óptima de biomasa y el consumo de energía lumínica (Liyanaarachchi et al., 2020, Medhi y Kalita, 2021).

Por lo expuesto, el propósito de esta iniciativa de investigación buscó optimizar la producción de biomasa de *H. pluvialis* a escala de laboratorio. Además, se planteó evaluar la eficacia de medios no tradicionales como el fertilizante FV y/o el ER, que no se habían probado con anterioridad. Con el fin de que, al menos, uno de los medios alternativos ensayados y una combinación de las condiciones de temperatura y luz establecidas en el laboratorio favorezcan un buen rendimiento del cultivo de *H. pluvialis*, se buscó una

alternativa para que los costos de producción disminuyan (Gómez et al., 2013). Asimismo, se pretendió, utilizar M1B5 como medio de referencia para saber si los alternativos resultan eficaces en la producción de biomasa (Niño et al., 2017). A través de la implementación de esta propuesta, se aspiró proporcionar respuesta a las siguientes preguntas de investigación: ¿Qué medios de cultivo alternativos podrían optimizar la producción de biomasa y, al mismo tiempo, disminuir los costos de producción? ¿Cómo influyen la luz, la temperatura y la aireación en el crecimiento de *H. pluvialis*?

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar medios de cultivo alternativos para la maximización de la biomasa en la fase verde de *Haematococcus pluvialis* a escala laboratorio.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Evaluar el crecimiento en la fase verde de *H. pluvialis* en medios de cultivo alternativos.
- b. Examinar si el o los medios de cultivo alternativos propuestos pueden reemplazar de forma efectiva al medio comercial para la producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, qué fuente de luz resulta más idónea y si se requiere o no de aireación para su cultivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación fue de tipo experimental porque se manipularon condiciones ambientales (tratamientos) sobre una población (microorganismos) y se observaron los efectos generados sobre otras variables (crecimiento poblacional) en una situación de control (Sampieri, Fernández y Baptista, 2006). Se utilizó la microalga *H. pluvialis*, adquirida en Algae Bank México para asegurar su pureza. Esta cepa fue cultivada

en dos medios alternativos, se utilizó un medio comercial como control, M1B5, y se procuró generar condiciones de crecimiento con la menor intervención posible.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de la microalga, se utilizaron tres medios de cultivo, M1B5 como uno de los medios comerciales utilizados para producir mayor tasa de crecimiento de *H. pluvialis* (Scardoelli-Truzzi y Sipaúba-Tavares, 2017) y dos alternativos orgánicos, FV y ER, como potenciales opciones para abaratar costos del cultivo. Por otro lado, se buscó establecer si resultaba mejor cultivarlos sin aireación o con aireación y bajo condiciones de luz artificial o natural, en vista de que se pretendió facilitar la producción de biomasa a escala laboratorio, sin mayores requerimientos de espacio o insumos sofisticados. La composición específica de los medios de cultivo puestos a prueba consta en los Anexos 1, 2 y 3.

Se establecieron dos experimentos, uno sin aireación, para determinar si se podía abaratar costos sin afectar el crecimiento o generar estrés en la microalga (Mularczyk, Michalak y Marycz, 2020); y otro con aireación continua para comparar y determinar cuál resultaba el más efectivo (Niño et al., 2017). Para el experimento sin aireación, se evaluaron dos temperaturas, ambiente y temperatura alcanzada bajo lámparas fluorescentes a una intensidad baja de $75 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e intensidad de luz ambiental o bajo lámpara LED 'Light Emitting Diode' (Diodo Emisor de Luz). Se empleó un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Waterbury, 2006).

Para el medio de cultivo FV, se preparó una concentración de 0.8% del fertilizante (Anexo 1) y se aforó con agua destilada en botellas Boeco de 1 L estériles (Edifarm, s.f.). El medio de cultivo ER se preparó mediante el procesamiento de 220 g de pétalos de rosa junto con agua destilada en una licuadora, posterior a eso se tamizó para obtener el concentrado líquido (Anexo 2) y se aforó con agua destilada en botellas Boeco de 1 L estériles (De Lima et al., 2019). Para la preparación del medio M1B5, se disolvieron $0,45 \text{ g L}^{-1}$ de medio M1B5 y 1.0 mL de solución de micronutrientes en agua bidestilada y los tres medios se esterilizaron a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, por 15 minutos (UTEX, s.f.)

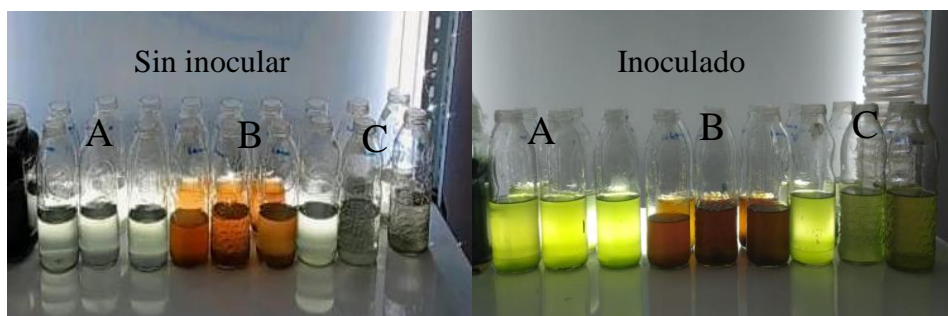


Figura 1. Montaje del experimento sin aireación con sus tres réplicas respectivas antes de ser inoculado y después de la inoculación de la microalga. A, M1B5; B, Extracto de Rosas; C, Fuerza Verde.

El cultivo se realizó en botellas de vidrio de capacidad de 250 mL, con un volumen de cultivo de 200 mL, simulando un biorreactor cerrado. Para el experimento sin aireación, a la fase verde de *H. pluvialis* se aplicaron los tratamientos, que se confeccionaron por triplicado: a) medio de cultivo FV a intensidad de luz y temperatura ambiente (FVS); b) medio de cultivo Fuerza Verde bajo luz LED y temperatura artificial (FVL); c) medio de cultivo ER a intensidad de luz y temperatura ambiente (ERS); d) Extracto de Rosas bajo luz LED y temperatura artificial (ERL); e) M1B5 a intensidad de luz y temperatura ambiente (M1B5S); f) M1B5 bajo luz LED y temperatura artificial (M1B5L) (Figura 1). Se midió como variable dependiente el crecimiento de la biomasa en densidad de células $\times 10^5$ células ml^{-1} (Niño et al., 2017).

Para el experimento con aireación, se utilizaron únicamente los medios de cultivo M1B5 y FV. El medio ER fue descartado, debido a que demostró ser muy susceptible a contaminación por otros microorganismos como bacterias y levaduras, lo que dificultó el crecimiento de la microalga. Por otro lado, se evaluaron las mismas dos condiciones de luz y temperatura antes ensayadas sobre la fase verde de *H. pluvialis*, con el mismo volumen de cultivo, pero por duplicado: a) medio de cultivo FV a intensidad de luz y temperatura ambiente (FVS); b) medio de cultivo FV bajo luz LED y temperatura artificial (FVL); c) medio de cultivo M1B5 a intensidad de luz y temperatura ambiente (M1B5S); d) medio de cultivo M1B5 bajo luz LED y temperatura artificial (M1B5L).

Para caracterizar el crecimiento algal conseguido bajo cada medio de cultivo y condición experimental, se realizó una curva de densidad celular algal observada a lo largo del tiempo, mediante recuento en una cámara de Neubauer. Se analizaron para el ensayo sin

aireación seis tratamientos, con tres réplicas, analizadas mediante tres alícuotas durante un período de 30 días, lo que significó un total de 54 recuentos por cada tratamiento y cuatro tratamientos, con dos réplicas mediante tres alícuotas dando un total de 24 recuentos por tratamiento bajo aireación (Niño et al., 2017, con modificaciones).

Para analizar si más de dos tratamientos diferían significativamente entre sí en el crecimiento algal obtenido en días específicos, se requirió de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos del análisis de variancia (ANOVA). En caso de diferencias significativas, se aplicó la prueba Post Hoc de Kruskal-Wallis para determinar cuál de los tratamientos eran diferentes significativamente mediante el software SPSS versión 25 (Estamática, 2020).

5. RESULTADOS

5.1. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis* SOMETIDO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SIN AIREACIÓN

El medio de cultivo y las condiciones de incubación demostraron influir considerablemente en el crecimiento algal. El periodo de adaptación de las microalgas, por ejemplo, fue marcadamente más larga en el tratamiento M1B5L. No existieron mayores cambios en el número algal entre los días 1 y 5 mientras el aumento poblacional en los demás tratamientos fue marcado desde el segundo recuento (Figura 2).

Por otro lado, se observó que los medios expuestos a luz solar obtuvieron una mayor duración de la fase exponencial que los tratados con luz LED. El tratamiento M1B5S tuvo la fase de crecimiento exponencial más larga de todos: desde el día 1 hasta el día 19. Precisamente para el día 19, se había alcanzado el inicio de la fase estacionaria en todos los tratamientos evaluados, de manera que pudo hacerse su seguimiento a lo largo de, al menos, 10 días.

En los días 8, 15 y 19, se detectaron picos de crecimiento distintivos (Figura 2, Tabla 1) entre los seis tratamientos con sus tres réplicas respectivas analizadas por triplicado. Se decidió interrumpir los tratamientos en medio ER a partir del día 19, debido a que el crecimiento algal se vio completamente comprometido por la proliferación de contaminaciones microbianas (Figuras 3).

Para los días 8, 15 y 19, se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($N_8 = 9$; $g_{18} = 5$; $H_8 = 45,418$; $p_8 < 0,000$ [Anexos 4 a 7]; $N_{15} = 9$; $g_{15} = 5$; $H_{15} = 51,080$; $p_{15} < 0,000$ [Anexos 8 a 11]; $N_{19} = 9$; $g_{19} = 5$; $H_{19} = 51,080$; $p_{19} < 0,000$ [Anexos 12 a 15]). En el día 8, el mejor crecimiento se observó en FVS, FVL y M1B5L (Anexo 7) y solo M1B5S prevaleció como la mejor opción hasta el día 19 (Anexo 15), con una densidad promedio de $10,76 \times 10^6$ células ml^{-1} (Tabla 1). Por el contrario, ERS y ERL fueron los que menor población algal produjeron a lo largo del experimento.

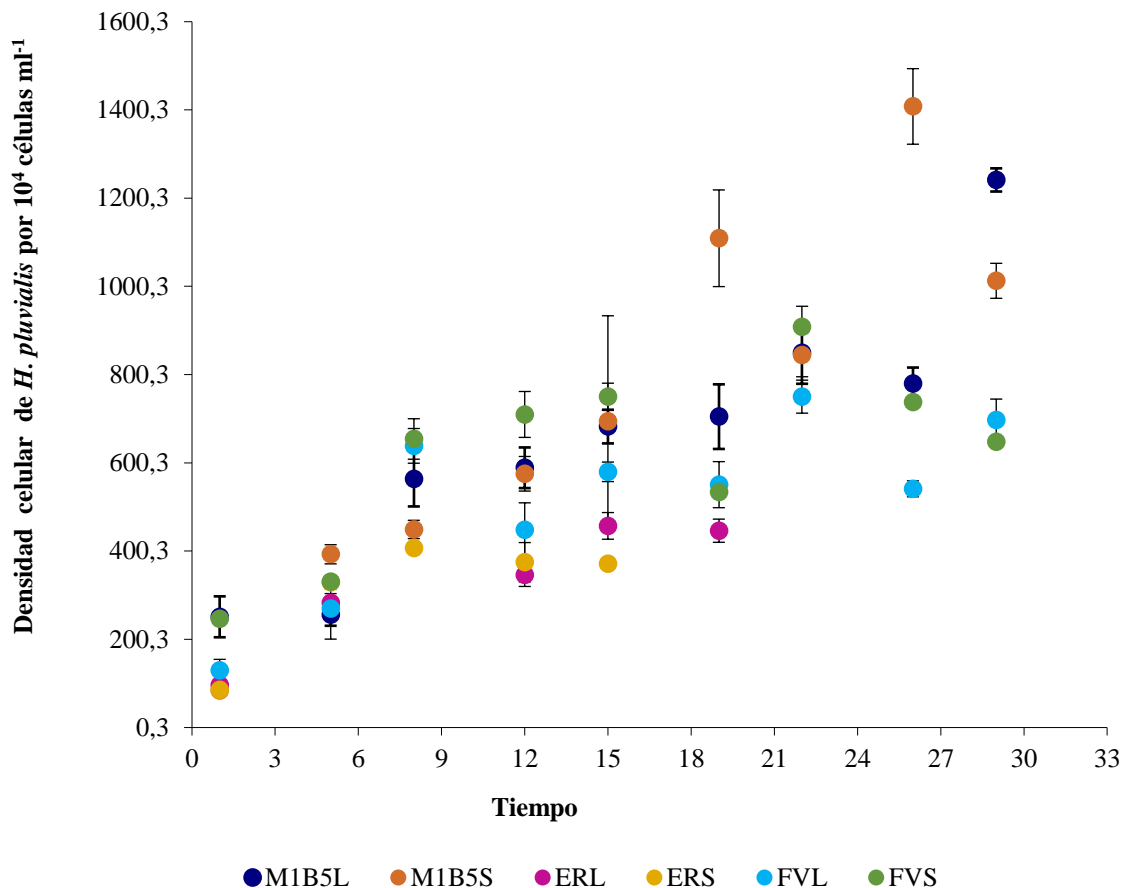


Figura 2. Densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados sin aireación. Marcadores, promedios de las densidades celulares obtenidas en las tres réplicas de cada tratamiento analizadas por triplicado; Barras, desviación estándar; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; ERL, Extracto de Rosas bajo luz LED; ERS, Extracto de Rosas bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

Tabla 1. Densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados sin aireación.

Tiempo	M1B5L		M1B5S		ERL		ERS		FVL		FVS	
	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest
1	251,303	46,357	84,333	2,620	96,583	2,311	85,750	2,361	129,917	24,941	246,667	5,492
5	256,250	25,256	393,000	21,691	283,167	20,801	329,420	14,854	269,678	68,872	330,583	14,189
8	563,979	69,143	462,642	22,555	335,258	26,291	448,613	20,704	638,809	35,644	654,460	47,374
12	589,167	46,072	575,580	39,130	457,417	26,297	406,830	9,004	448,083	61,569	710,000	52,015
15	682,527	38,678	774,322	9,157	446,543	26,899	375,750	48,571	572,583	24,036	757,000	36,357
19	693,563	79,752	1076,556	112,659	356,978	26,297	369,888	7,808	572,264	57,502	534,279	8,122
22	849,583	70,061	844,920	49,507					750,417	37,392	908,500	46,732
26	780,417	35,913	1408,250	85,634					541,417	18,076	737,667	11,1520
29	1241,583	26,278	1012,920	39,682					697,167	47,744	648,167	9,092

\bar{X} , promedio de la densidad celular (por 10^4 células ml^{-1}); Desvest, desviación estándar de la densidad celular; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio MIB5 bajo luz solar; ERL, medio Extracto de Rosas bajo luz LED; ERS, medio Extracto de Rosas bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

La coloración verde de las células en los tratamientos empleados se mantuvo durante todo el tiempo que duró la experimentación. No obstante, sí se observaron diferencias en el tamaño celular ($N_{\text{cel}} = 6$; $g_{\text{cel}} = 5$; $H_{\text{cel}} = 25,593$; $p_{\text{cel}} < 0,000$ [Anexos 16 a 19]). Las microalgas cultivadas en FVS fueron significativamente más anchas que las que se desarrollaron en los demás tratamientos (Anexos 19 y 20, Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Diámetro celular de *Haematococcus pluvialis* sometido a los diferentes tratamientos sin aireación.

Tratamiento	\bar{X} (μm)	Desvest
M1B5L	10,400	2,966
M1B5S	13,400	3,362
ERL	5,000	0,894
ERS	8,833	1,722
FVL	17,400	1,949
FVS	19,000	1,581

\bar{X} , promedio del diámetro celular (tres células por cada una de tres réplicas, es decir, nueve células por tratamiento); Desvest, desviación estándar del tamaño celular; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio MIB5 bajo luz solar; ERL, medio Extracto de Rosas bajo luz LED; ERS, medio Extracto de Rosas bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

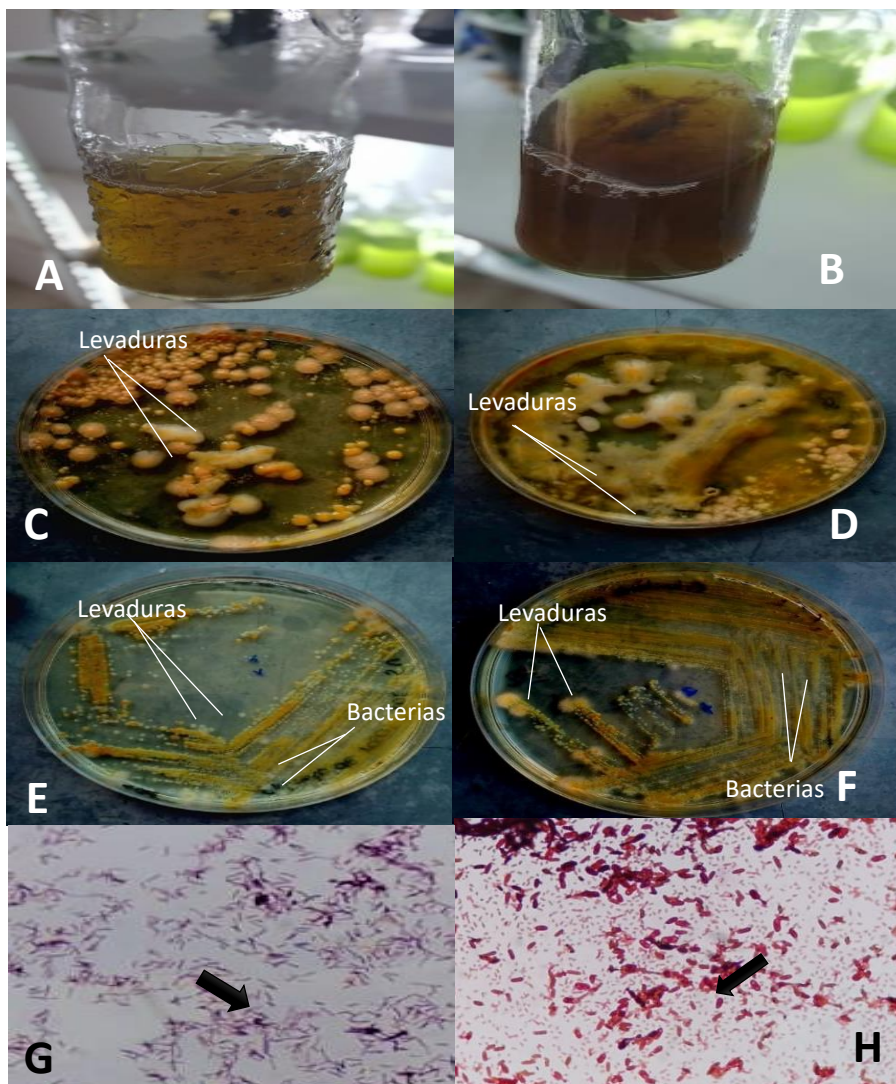


Figura 3. Contaminación registrada en el medio Extracto de Rosas (ER). A, Presencia de turbidez, grumos y partículas en suspensión en el medio con luz LED que no son características de *H. pluvialis*; B, Presencia de turbidez, grumos y partículas en suspensión en el medio con luz solar que no son características de *H. pluvialis*. C, Colonias de levaduras y bacterias obtenidas en agar nutritivo a partir del cultivo en suspensión bajo luz LED; D, Colonias de levaduras y bacterias obtenidas en Papa Dextrosa Agar (PDA) a partir de cultivo en suspensión bajo luz LED del medio; E, colonias de levaduras y bacterias obtenidas en agar nutritivo a partir del cultivo en suspensión bajo luz solar; F, Colonias de levaduras y bacterias obtenidas en PDA a partir del cultivo en suspensión bajo luz solar; G, Tinción Gram de una de las colonias bacterianas (bacilos grampositivos); H, Tinción Gram de una de las colonias de levaduras.

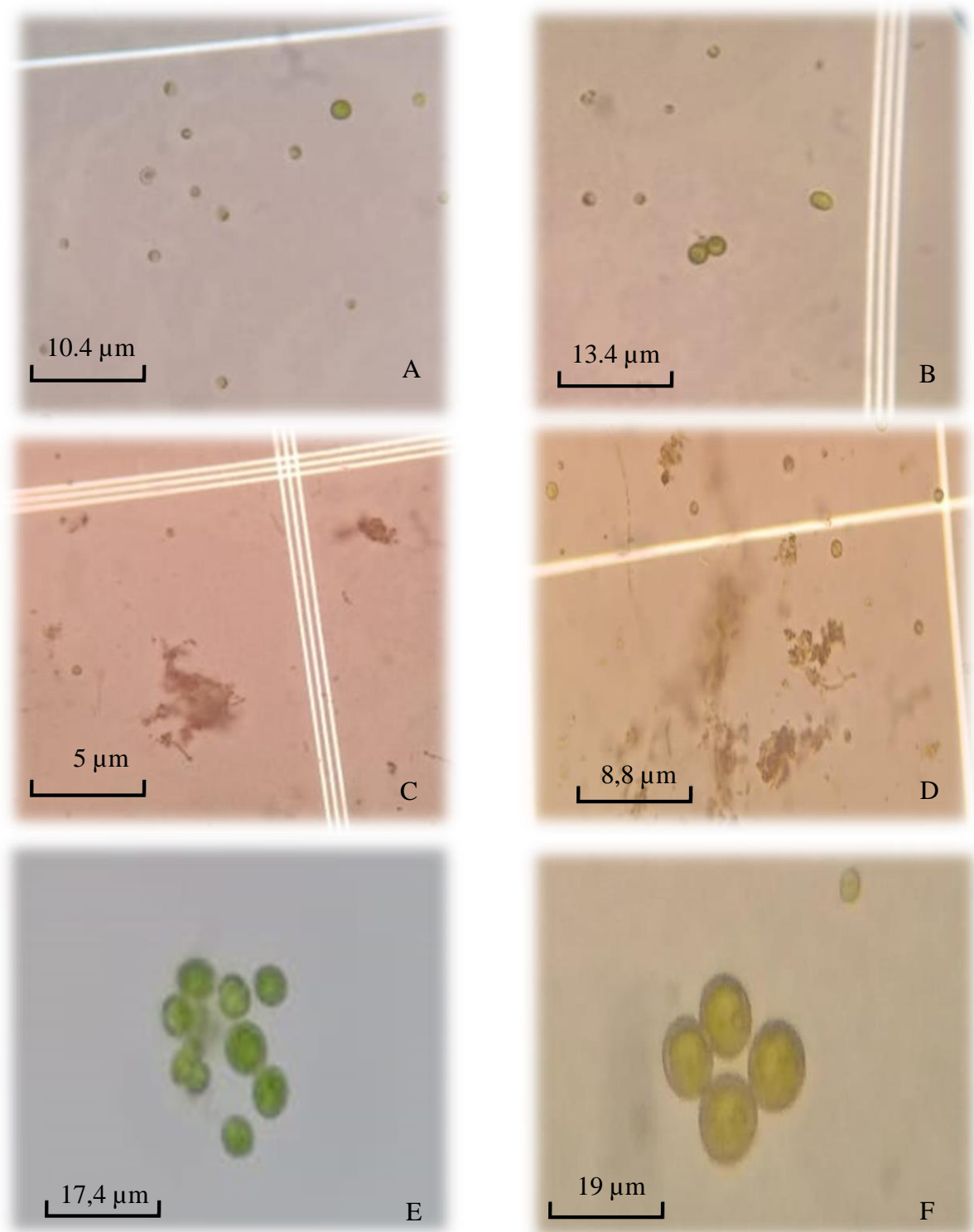


Figura 4. Diámetro celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* en los tratamientos sin aireación. A, M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; B, M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; C, ERL, Extracto de Rosas bajo luz LED; D, ERS, Extracto de Rosas bajo luz solar; E, FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; F, FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

5.2 INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis* SOMETIDO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS BAJO AIREACIÓN

Los promedios y desviaciones estándar del crecimiento de la microalga *H. pluvialis* sometida a los diferentes tratamientos ensayados bajo condiciones de aireación figuran en la Tabla 3. Se evidenció que las microalgas en el medio M1B5S y FVS presentaron una fase de adaptación similar entre sí, más lenta que la evidenciada en los otros tratamientos. Por su parte, FVS presentó la fase exponencial más larga entre todos los tratamientos: desde el día 7 hasta el día 14.

Tabla 3. Densidad celular obtenida en los diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación empleados bajo régimen de aireación constante.

Tiempo	M1B5L		M1B5S		FVL		FVS	
	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest	\bar{X}	Desvest
1	12851,351	407,163	3672,547	200,306	1898,004	207,274	719,869	74,372
3	27904,246	489,431	3152,414	362,244	4136,578	158,969	1868,336	229,079
7	17598,521	3334,213	31239,592	1999,734	56704,670	8017,280	86546,293	13265,873
11	216290,685	5011,461	133706,250	3542,963	56146,878	6930,949	274408,170	16745,125
14	219487,695	15857,549	122228,146	12310,179	135488,370	14342,155	602738,680	12728,251
17	186530,078	42808,187	124802,757	13473,567	131963,696	15236,450	619336,004	14588,897
21	133961,290	23771,189	294943,229	30250,928	128337,757	17606,193	604453,784	18831,428
24	196185,092	22670,919	507727,862	54173,718	121384,946	17344,951	582870,232	31094,678
28	189853,520	39980,850	276716,765	31610,611	167932,864	26222,556	547577,930	12538,532
31	224720,922	54133,615	189507,692	28017,719	84689,876	12970,660	608345,272	28902,643

\bar{X} , Promedio de la densidad celular (10^4 cel. ml^{-1}); Desvest, desviación estándar de la densidad celular final; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

Se detectaron diferencias en las densidades celulares obtenidas entre tratamientos en los días 11 y 14 de experimentación (Figura 5, Anexos 21 a 28), correspondientes a los días en los que se dio por concluida la fase de crecimiento exponencial para los cuatro tratamientos con sus dos réplicas ($N_{11} = 6$; $g_{11} = 3$; $H_{11} = 21,600$; $p_{11} < 0,000$ [Anexos 21 a

24]; $N_{14} = 6$; $g_{14} = 3$; $H_{14} = 21,609$; $p_{14} < 0,000$ [Anexos 25 a 28]). Al día 11, el mejor crecimiento algal se obtuvo en el tratamiento FVS, en contraste a FVL que resulta el menos efectivo inclusive que M1B5 con y sin aireación (Anexo 24). Por otro lado, para el día 14, el crecimiento fue significativamente mejor en FVS, seguido muy de lejos por FVL y éste de las dos versiones de M1B5 (Anexo 28).

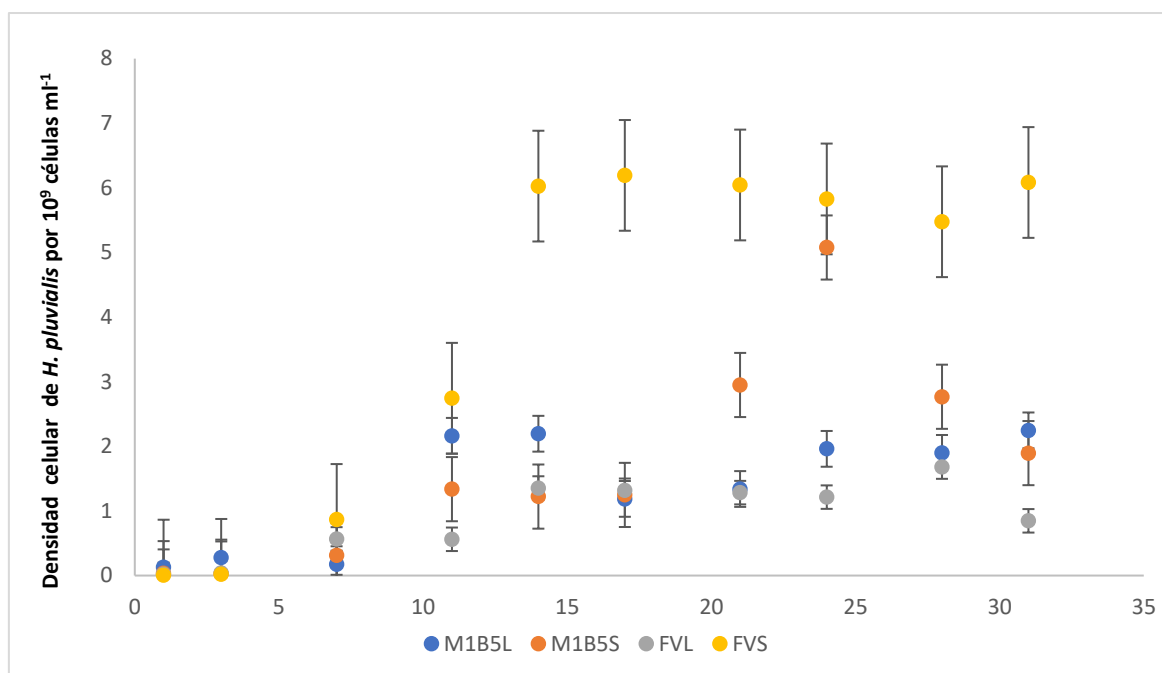


Figura 5. Densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* obtenida bajo los diferentes tratamientos ensayados con aireación. Marcadores, promedios de las densidades celulares obtenidas en las dos réplicas de cada tratamiento analizadas por triplicado; Barras, desviación estándar; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

Por otro lado, al contrario del experimento sin aireación, el medio de cultivo y sus condiciones de incubación no influyeron significativamente en el tamaño de las células desarrolladas ($N = 20$ $g_l = 3$; $H = 1,986$; $p < 0,575$ [Anexos 29 y 30]; Tabla 4, Figura 6). Además, la coloración verde de las células se mantuvo en todos los tratamientos.

Tabla 4. Diámetro celular obtenido en los diferentes tratamientos ensayados con aireación.

Tratamiento	\bar{X} (μm)	Desvest
M1B5L	9,500	3,259
M1B5S	10,500	5,419
FVL	10,500	3,259
FVS	12,000	2,738

\bar{X} , promedio del tamaño celular (tres células por réplica, nueve por tratamiento); Desvest, desviación estándar del tamaño celular; M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED; M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

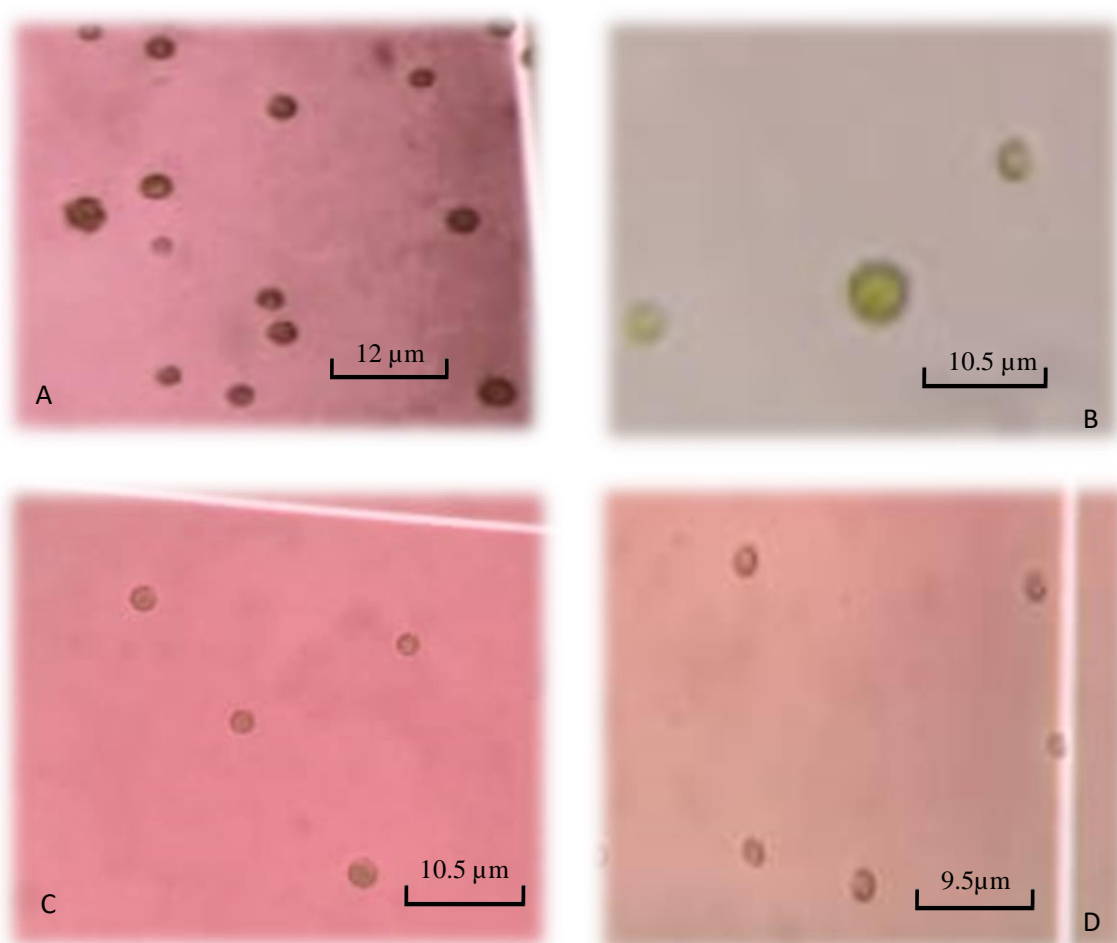


Figura 6. Tamaño celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* en los diferentes tratamientos ensayados con aireación. A, FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar; B, M1B5S, medio M1B5 bajo luz solar; C, FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; D, M1B5L, medio M1B5 bajo luz LED.

6. DISCUSIÓN

a. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS PARÁMETROS DE CULTIVO CONTROLADOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Haematococcus pluvialis* A ESCALA LABORATORIO

En los últimos años, se han consolidado varias propuestas de bioprospección y aprovechamiento en microalgas. Gracias a su versatilidad, se las ha utilizado en diversas aplicaciones como, por ejemplo, en la producción de biomasa como base para la fabricación de biocombustibles, suplementos alimenticios, fertilizantes, entre otros (Cajamar, 2015).

Justamente, *H. pluvialis* constituye una microalga de gran interés comercial. El pigmento que produce, la astaxantina, presenta propiedades antioxidantes, efecto preventivo contra algunas enfermedades y sirve como pienso para animales de criadero que les proporciona mayor valor agregado, entre otros (Ambati, Phang, Ravi y Aswathanarayana, 2014). Es por esta razón que resulta indispensable generar grandes cantidades de biomasa durante la fase verde. Esto se logra al proporcionar elementos esenciales como nitrógeno, fósforo, oxígeno, sodio, calcio, azufre, hierro y zinc. También, se requiere de vitaminas y aminoácidos para su crecimiento. Debe velarse, además, por proporcionarle condiciones ambientales apropiadas entre las que se encuentran aireación, temperatura (25-30°C) e intensidad de luz (26 - 120 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para iniciar la fase roja con el mayor número de células posible en las que se habría favorecido la acumulación del pigmento (Escuredo, 2014; Niño et al., 2017).

H. pluvialis es una microalga de crecimiento lento y difícil cultivo, debido a que es más susceptible a daños hidrodinámicos y al complejo ciclo celular que presenta. Se identifican cuatro formas celulares: macrozooides, microzooides, palmeloides y hematocistos (Jiménez, 2017). Cada uno de estos estadios se presenta en condiciones ambientales diferentes (Niño et al., 2017). Las primeras dos fases se desarrollan con los parámetros descritos anteriormente, mientras que las dos últimas etapas se ven desencadenadas bajo condiciones como temperatura que

supera los 30°C, una intensidad de luz mayor a 5000 lux y alta salinidad en el medio de cultivo (Ramírez, 2013).

En la actualidad, la mayoría de empresas dedicadas al cultivo de esta microalga, como por ejemplo Cyanotech (Hawái), utiliza fotobiorreactores con sistemas cerrados donde solo se permite la entrada de agua y aire esterilizados por filtración para mantener la pureza, reducir la probabilidad de contaminación que limite el cultivo a gran escala, controlar los parámetros ambientales y mejorar la tasa de duplicación algal. Estos fotobiorreactores están enfocados en estresar de manera rápida a las células, con el fin de promover la producción de astaxantina (Camacho, Lancheros y Díaz, 2021; Cyanotech, 2018).

Otro ejemplo es el cultivo de *H. pluvialis* de la Universidad de Utrecht (Países Bajos) que utiliza un fotobiorreactor tubular horizontal durante la fase verde, debido a que se pueden controlar las condiciones de temperatura, luz y agitación mediante un sistema de inyección de aire. En la fase roja, se usan estanques *raceway* dentro de un invernadero para que se mantenga la temperatura adecuada y, además, funcione como barrera física para disminuir contaminaciones con otros microorganismos. Este sistema permite disminuir costos de producción y favorece la concentración de astaxantina. El pH suele verse afectado, pero no provoca sino mayor estrés a las células, que se traduce en mayor producción del pigmento buscado. Sin embargo, en este cultivo se emplean intensidades de luz superiores a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin tomar en cuenta que esto afecta la productividad de biomasa (Panis y Rosales, 2016). Por consiguiente, resulta importante controlar, especialmente, la intensidad de luz para alcanzar una biomasa a gran escala de esta microalga en particular (Algatex Biotechnology, 2022; Panis y Rosales, 2016).

En otros estudios, en cambio, para conseguir una biomasa significativa durante la fase verde, se somete a la célula a cultivo semicontinuo con el fin de alcanzar la fase estacionaria de forma rápida y sostenida (Niño et al., 2017). Este fue el tipo de cultivo que se adoptó en el presente estudio, pues se administró semanalmente entre 100 a 150 ml de medio de cultivo, es decir, una reposición de entre 50 y 75%, en los fotobiorreactores hasta que el alga alcanzó la fase estacionaria. Al mismo tiempo, se evaluaron varios parámetros que influenciaron

el crecimiento celular de *H. pluvialis*. Entre ellos, destacó principalmente la fuente de luz: natural o artificial.

La luz es una fuente esencial para el crecimiento autótrofo de las microalgas y el elemento más importante para la actividad fotosintética, la multiplicación celular y la respiración (Metsoviti, Papapolymerou, Karapanagiotidis y Katsoulas, 2019). La luz solar abarca los espectros visible, infrarrojo y ultravioleta, con longitudes de onda situadas por debajo de los 400 nm y superiores a los 700 nm. Como afirman Pattanaik, Behari y Pradhan (2018), este rango es el ideal para el crecimiento algal. En contraste, la luz LED comprende solo el espectro visible (luz blanca) que limita el sistema fotosintético y, por ende, el crecimiento celular (Sunlight inside, 2022). Por otro lado, la utilización de espectros de luz LED específicos como la luz roja aumentan la densidad celular o la luz azul que promueve la acumulación de astaxantina, procesos que también favorece la luz solar (Hernández, Pérez, Jáuregui, Alcántara y Hurtado, 2015). Por ejemplo, Stunda, Zuteris y Rugele (2018) destacan a la luz solar como una fuente idónea para el cultivo de *Arthrospira*, además de resaltar su bajo costo, eficiencia energética y ambiental. Sin embargo, resulta importante considerar que los cambios en la intensidad de radiación influyen en el crecimiento algal. De hecho, fue lo que pudo comprobarse tanto en el ensayo con aireación como en el sin aireación, pues la luz solar resultó favorecer más el crecimiento algal que la luz blanca (Figuras 2 y 5).

Otro de los factores evaluados fue la aireación, crucial para la distribución homogénea de nutrientes, células, metabolitos, calor y transferencia de gases, además de evitar la sedimentación microalgal (González, 2015). En el primer ensayo, sin aireación, el número de células no incrementó de forma similar al del ensayo con aireación. La producción de biomasa monoalgal fue lenta e incluso susceptible a contaminación. Por el contrario, en el segundo ensayo, la aireación favoreció la disponibilidad de nutrientes para las células, de modo que se proporcionaron condiciones adecuadas para un crecimiento poblacional más elevado (González, 2015). De forma similar, Ocaña, Pacurucu y Díaz (2021) obtuvieron en cultivos de las clorofitas *Closterium*, *Monoraphidium*, *Golenkinia*, *Characium*, *Chlorella*, *Coelastrum*, *Desmodesmus*, *Staurastrum*, *Chlamydomonas* y *Coccomyxa* un menor crecimiento celular y una llegada más rápida a la fase de

muerte en tratamientos sin aireación, en contraste con los tratamientos aireados. Esto concuerda con los resultados de la presente investigación, que corroboran la importancia de la aireación para la obtención de grandes cantidades de biomasa de esta microalga específica.

b. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Haematococcus pluvialis* A ESCALA LABORATORIO

Los medios de cultivo son importantes para impulsar el crecimiento de microorganismos con potencial beneficioso en distintas industrias. En el caso de las microalgas, estos aportan macro y micronutrientes que contribuyen a la producción de biomasa y pigmentos con el fin de ser comercializados y obtener nuevas alternativas sustentables.

En el experimento sin aireación, se ensayaron dos medios no tradicionales de bajo costo para el cultivo de microalgas: un fertilizante agrícola, Fuerza Verde, y Extracto de Rosas. Se comparó su eficacia frente al medio comercial y específico para *H. pluvialis*, M1B5. Este último, si bien es económico (\$ 0.04 m⁻³), es elaborado a partir de dos fertilizantes hidropónicos: Flora Micro y Flora Bloom que, de acuerdo a las concentraciones adecuadas para esta microalga, se mezcla en proporción 1:5, respectivamente (Butler, 2021). Sin embargo, ni estos fertilizantes ni el medio de cultivo preparado se encuentran disponibles en el país y resulta difícil obtenerlos. Además, requiere de vitaminas de difícil acceso. Por tanto, el estudio se enfocó en buscar una alternativa económica, accesible y funcional para el cultivo de esta microalga (Algaebank, 2021).

Como otra opción, se preparó el medio Extracto de Rosas de forma aséptica para evitar contaminantes presentes en las rosas. Se lavó los pétalos con agua estéril, se los maceró y trituró para obtener el concentrado. Este se aforó a un litro de agua destilada estéril y se procedió a autoclavar el medio antes de su inoculación con *H. pluvialis*. Este procedimiento se realizó con todas las medidas de bioseguridad, la utilización del equipo de protección personal adecuado y mechero para propiciar una atmósfera estéril. No obstante, en las primeras semanas, se observó la presencia

de bacterias y levaduras, específicamente a partir del día 8. Para el día 19, habían proliferado más que la microalga misma (Figura 3).

La única fuente de contaminación probable se reduce a un proceso de esterilización insuficiente para las propiedades de este medio, donde las contaminaciones fueron recurrentes a pesar de que fue sometido a las mismas condiciones asépticas de preparación que los demás medios utilizados en estos ensayos (Merck, 2022). Sin embargo, la contaminación advertida pudo provenir de una fuente distinta. En efecto, a pesar de tratarse de cultivos monoalgales, *H. pluvialis* puede desarrollarse junto con otros microorganismos acompañantes que, incluso, pueden promover su desarrollo durante la fase exponencial o adaptarse mejor al medio y disminuir el crecimiento de esta microalga (Lee et al., 2019). En consecuencia, en el presente estudio, se cree que los microorganismos acompañantes fueron más competitivos en el uso de nutrientes que *H. pluvialis*. Por tanto, no fue recomendable este medio de cultivo alternativo en futuros experimentos. De cualquier manera, el control o incluso la eliminación definitiva de bacterias y hongos en la preparación y el mantenimiento de los medios de cultivo durante la fase verde resulta esencial para promover el crecimiento celular y la síntesis de lípidos en *H. pluvialis*, así como en otras algas (Yan et al., 2021).

Por otro lado, para evaluar la concentración celular microalgal, se utiliza un espectrofotómetro y se debe tener en cuenta que, si la muestra está contaminada por bacterias, residuos o cualquier tipo de partícula, el método dará respuestas erróneas. El equipo lee la absorbancia de la muestra contaminada, lo que perjudica en la estimación de astaxantina presente mediante una medición diferente a la esperada (anómala) (Hitachi High-Tech Analytical Science, 2020; Rodríguez, 2019). No obstante, una vez extraído el metabolito de interés, la biomasa residual se convierte en un polvo de color marrón claro útil en la industria agrícola como un biofertilizante rico en compuestos químicos (Panis y Rosales, 2016).

Otras microalgas han demostrado desenvolverse bien en medios de cultivo distintos a los comerciales. Es el caso de *Scenedesmus*. El tamaño de sus células oscila entre 2 a 10 μm de ancho cuando se desarrollan en medio comercial y, en el fertilizante foliar 11N8P6K, se han obtenido medidas de 4,19 a 4,97 μm , un buen

tamaño relativo que demuestra que se puede cultivar microalgas de forma menos costosa a la implicada en el uso de medios comerciales (Soplín, 2015).

Las dimensiones de *H. pluvialis* oscilan entre 10-15 μm de diámetro en la fase verde de su ciclo de vida (Damiani, 2010). Durante la fase roja, la célula alcanza un diámetro de 22 a 50 μm que duplica el tamaño de la fase verde, debido a la acumulación de pigmentos que se produce (Camacho, González y Klotz, 2013). En este estudio, enfocado en la fase verde, el fertilizante Fuerza Verde permitió alcanzar un tamaño celular mayor al obtenido en el medio comercial. En el ensayo sin aireación el tamaño celular mayor fue de $19 \pm 1,581 \mu\text{m}$, alcanzado en FVS, y el menor de $5 \pm 0,894 \mu\text{m}$ en ERL, aunque éste último no fue estadísticamente diferente al obtenido en M1B5S o M1B5L. En el experimento con aireación, el mayor tamaño celular se registró en el tratamiento FVS con $12 \pm 2,738 \mu\text{m}$ y el menor fue en M1B5L con $9,5 \pm 3,259 \mu\text{m}$.

Por otra parte, existen fertilizantes que, en términos de productividad de biomasa, arrojan valores mayores o equivalentes con respecto a los medios convencionales para microalgas (Silva, 2016). La preparación de un litro del fertilizante Fuerza Verde, que sí resultó adecuado para el cultivo de *H. pluvialis*, costaría \$ 0,35: una excelente opción para la reducción de costos en el cultivo (Agrizon, 2022) y alcanzar alta densidad celular algal.

Efectivamente, al utilizar Fuerza Verde en cultivo con aireación bajo luz solar, se alcanzaron $6,19 \times 10^9 \pm 0,146$ células ml^{-1} , una densidad celular que no pudo ser superada por las $5,07 \times 10^9 \pm 0,542$ células ml^{-1} obtenidas en el medio comercial M1B5S. No sucedió lo mismo en ausencia de aireación, pues las diferencias en las densidades celulares fueron contrastantes, con $14,08 \times 10^6 \pm 0,856$ células ml^{-1} en M1B5S, $4,48 \times 10^6 \pm 0,207$ células ml^{-1} en ERS y $9,08 \times 10^6 \pm 0,467$ células ml^{-1} en FVS. Esto demostró que, para el cultivo de *H. pluvialis*, la aireación resulta fundamental para mantener la fase verde en crecimiento adecuado. Además, mediante la utilización de Fuerza Verde, se le estarían proporcionando al alga nutrientes adicionales que aportarían mayores beneficios en términos de biomasa algal.

Efectivamente, los componentes del fertilizante agrícola promulgaron el crecimiento adecuado de la biomasa algal, puesto que no solamente las células alcanzaron un buen tamaño, sino que especialmente el fósforo contribuyó a proporcionar soporte a las reacciones energéticas de la célula, la formación de membranas y la síntesis de ácidos nucleicos (Karuppan et al., 2022). Además, las funciones fisiológicas específicas proporcionadas por las fitohormonas presentes en el fertilizante, como división celular, respiración, estimulación del contenido de lípidos y producción de biomasa, contribuyeron en el crecimiento algal (Auz, 2019), elementos clave del fertilizante ausentes en el medio comercial.

Adicionalmente, el crecimiento algal obtenido en los medios sin aireación demostró que FVS se presenta como la alternativa de cultivo que requiere menos tiempo para alcanzar la fase estacionaria y empezar con la producción de astaxantina. Leiton (2018) obtuvo una densidad celular de 1×10^6 células ml^{-1} en M1B5 con luz LED. Sin embargo, en el tratamiento M1B5S sin aireación de la presente investigación se prolongó la fase de crecimiento exponencial hasta el día 19, la más larga entre todos los tratamientos, obteniendo una densidad promedio de $10,76 \times 10^6 \pm 1,12$ células ml^{-1} . Por tanto, la densidad celular de *H. pluvialis* depende claramente del medio de cultivo empleado y las condiciones de incubación que se le proporcionen (Colusse, Rabello, de Carvalho y Nosedá, 2019).

Al comparar las fases de crecimiento de la microalga tanto en el medio comercial como en el fertilizante Fuerza Verde en condiciones de aireación, la fase de latencia en los dos medios de cultivo duró únicamente tres días desde la inoculación de *H. pluvialis* y las densidades celulares en ese periodo para todos los tratamientos fueron similares. Por el contrario, la fase exponencial en M1B5S culminó el día 11, mientras que en FVS se prolongó hasta el día 14 con densidades celulares de $1,33 \times 10^9 \pm 0,35$ células ml^{-1} y $6,02 \times 10^9 \pm 1,27$ células ml^{-1} , respectivamente. Por último, en los dos medios, la fase estacionaria se prolongó más allá del día 31. No obstante, en términos de rendimiento, ambos medios de cultivo fueron iguales y efectivos: en M1B5S fue de $5,077 \times 10^9 \pm 5,41$ células ml^{-1} , alcanzado en el día 24, y en FVS fue de $6,19 \times 10^9 \pm 1,46$ células ml^{-1} en el día 17. Esto demostró que el fertilizante agrícola Fuerza Verde es un medio propicio para el crecimiento de esta microalga, pues no solo alargó la fase de crecimiento

exponencial, sino que alcanzó el mismo rendimiento que el medio comercial, pero en menor tiempo.

Fuerza Verde no se había empleado previamente como una opción para el cultivo de microalgas. No obstante, puede compararse su efectividad con abonos agrícolas similares como, por ejemplo, con *Dunaliella cf. viridis* se utilizó el fertilizante foliar F1 y se obtuvo una densidad de $1,22 \times 10^7$ células ml^{-1} , el bioestimulante líquido F2 con $7,78 \times 10^6$ células ml^{-1} y el fertilizante F3 con $1,05 \times 10^7$ frente a $2,11 \times 10^7$ células ml^{-1} del medio comercial Johnson bajo luz LED (Pastuzo, 2016). Como se comentó, en Fuerza Verde pueden obtenerse hasta $6,19 \times 10^9 \pm 1,46$ células ml^{-1} , una densidad celular admirable.

Otro estudio indica que, con el fertilizante agrícola Crecilizer bajo luz LED, se obtiene una densidad de $6,19 \times 10^5$ células ml^{-1} con la microalga *Tetraselmis sp.* frente a $1,9 \times 10^5$ células ml^{-1} con el medio comercial F/2 de Guillard (Montoya y Acosta, 2021). En la presente investigación, se registraron densidades celulares de *H. pluvialis* de $1,67 \times 10^9$ células ml^{-1} en FVL frente a $1,89 \times 10^9$ células ml^{-1} de M1B5L. Por tanto, Fuerza Verde como medio alternativo para *H. pluvialis* bajo luz LED alcanzó similares resultados en términos de producción de biomasa que el medio comercial y demostró ser una excelente opción, eficaz y económica, para el cultivo de esta microalga a escala laboratorio (Muñoz, Ramírez, Otero, Medina, Cruz y Velasco, 2012). Además, es una de las opciones disponibles en el mercado que cumple con los requerimientos de esta microalga y que fomenta el crecimiento algal más allá de lo que podría esperarse en el medio comercial.

7. CONCLUSIONES

1. El crecimiento de *H. pluvialis* a escala laboratorio es estrechamente dependiente del medio de cultivo empleado y de las condiciones de incubación que se le proporcionen. Varias son las formas de cultivo de *H. pluvialis* que han resultado efectivas a la hora de proveer biomasa, pero todas coinciden en que la fase verde requiere un estricto control de la contaminación ambiental y de los parámetros de

incubación para favorecer el crecimiento algal, como se ha corroborado en este estudio.

2. Debido al interés comercial detrás de la necesidad de producir grandes cantidades de biomasa de esta microalga durante la fase verde, la poca o nula disponibilidad del medio de cultivo comercial y su costo, se evaluaron dos medios de cultivo alternativos: Fuerza Verde y Extracto de Rosas. Fuerza Verde no solo resultó propicio y muy económico para el crecimiento de *H. pluvialis* en su fase verde, sino que permitió alcanzar un mayor tamaño celular, alargó la fase de crecimiento exponencial y culminó con el mismo rendimiento que el medio comercial, pero en menos tiempo. Además, proporcionó a las microalgas componentes ausentes en el medio comercial que facilitaron mayor soporte a las reacciones energéticas de la célula, la formación de membranas y la síntesis de ácidos nucleicos y propiciaron funciones fisiológicas específicas.
3. El fertilizante Fuerza Verde resultó atractivo también en caso de que en el laboratorio no pueda hacerse uso de la luz solar. Como medio alternativo para *H. pluvialis* bajo luz LED, alcanzó resultados similares en comparación con el medio comercial en términos de producción de biomasa.
4. El Extracto de Rosas, en cambio, favoreció más el crecimiento de la flora acompañante que el de la microalga misma, por lo que no resultó recomendable.
5. En la fase verde de *H. pluvialis*, es primordial controlar la intensidad de luz para asegurar el alto rendimiento de biomasa. Como la diferencia entre la luz solar y la luz LED radica en los espectros de luz disponibles para las algas y la luz LED abarca solo una porción de aquellos de la luz solar, se probaron ambas opciones: la luz solar resultó favorecer más el crecimiento de *H. pluvialis* que la luz blanca, tanto en condiciones de aireación como en su ausencia.
6. La producción de biomasa monoalgal en ausencia de aireación fue lenta y susceptible a contaminación. Esto corroboró que la aireación en el cultivo de *H. pluvialis* es un factor predisponente para el mejor aprovechamiento de los nutrientes independientemente del medio empleado.

7. Pueden cultivarse microalgas de forma menos costosa a la implicada en el uso de medios comerciales. Con esta investigación, se pudo corroborar que existen fertilizantes que, en términos de productividad de biomasa y tamaño celular, arrojan valores mayores o equivalentes a los medios convencionales para microalgas. El uso de fertilizantes agrícolas económicos aparece como una alternativa viable para el cultivo de *H. pluviialis*, tomando en cuenta que es una microalga de crecimiento lento y susceptible a contaminación. El fertilizante Fuerza Verde cumplió con los requerimientos de esta microalga y fomentó el crecimiento algal más allá de lo que podría esperarse en el medio comercial.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrizon. (2022). *Fuerza Verde Engrose Lila 6-13-36 1 kg*. Recuperado de <https://www.e-agrizon.com/producto/fuerza-verde-engrose-lila-6-13-36-1-kg/>
- Algaebank. (2021). *Medio de cultivo M1B5 (Ficha técnica)*. Recuperado de <https://algaebank.com.mx/?v=3fd6b696867d>
- Ambati, R., Phang, S., Ravi, S. y Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Marine drugs*, 12(1), 128–152. doi: <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Andrade, C. (2021). *Producción de Pigmentos Comerciales Astaxantina*. Recuperado de <http://bancodeideas.gob.ec/proyecto/view?data=aWQ9MTExOTQ%3D#:~:text=El%20Ecuador%20no%20produe%20Astaxantina,industria%20alimenticia%2C%20farmac%20C3%A9utica%20y%20cosm%20C3%A9tica>.
- Auz, E. (2019). *Efecto de ácido indol 3-acético (AIA) exógeno en la productividad de tres biotipos de Chlorella endémica del Ecuador*. Tesis de grado no publicada. Universidad de las Fuerzas Armadas, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/22044/T-IASAI-005578.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Borowitzka, M. (2013). High-value products from microalgae - their development and commercialization. *J. Appl. Phycol*, 25, 743-756. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Brito, D., Caña, E., Guevara, M., Subero, J. y Colivet, J. (2016). Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 4(1), 15-26. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.04.01.02>
- Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E. y Mora, R. (2013). Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Interciencia*, 38(8), 604-608. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33928557009>
- Butler, T. (2021). *The diatom Phaeodactylum tricornutum as a sustainable microalgal cell factory: towards a biorefinery approach*. Disertación doctoral no publicada, The University Of Sheffield, Sheffield, U.K. Recuperado de <https://etheses.whiterose.ac.uk/29308/1/PhD%20thesis%20Thomas%20Butler%20FINAL%20-%20160101722.pdf>
- Cajamar. (2015). *¿Qué son las microalgas?* Recuperado de <https://www.cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf>
- Calvo, M. (2018). *Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms*. Recuperado de

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21393/1/uy24-19243.pdf>

- Camacho, J., González, G. y Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.1022>
- Camacho, J., Lancheros, A. y Díaz, L. (2021). *Escalamiento del cultivo de Haematococcus pluvialis para la producción de astaxantina*. Cali, Colombia: Editorial Redipe.
- Camacho, J., Lancheros, D. y Huerfano, M. (2016). Condiciones de cultivo estándar relacionados con la producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1), 70-80. doi: <https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2016.2127>
- Camacho, P. y Castillo J. (2020). *Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/343555207_Microalgas_y_sus_aplicaciones_biotecnológicas
- Capelli, B., Talbott, S. y Ding, L. (2019). Astaxanthin sources: Suitability for human health and nutrition. *Functional Foods in Health and Disease*. 9(6), 430-445. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/335095942_Astaxanthin_Sources_Suitability_for_Human_Health_and_Nutrition
- Colluse, G., Rabello, M., De Calvaho, J y Nosedá, M. (2019). Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. *Bioresource Technology Reports*, 7, 1-7. doi: doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100236.
- Cruz, M. (2017). *Cultivo masivo de la microalga Haematococcus sp. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés*. Tesis de maestría no publicada, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. Recuperado de https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1889/1/tesis_Cruz_jim%C3%A9nez_Marco_Antonio_06_dic_2017.pdf
- Cyanotech. (2018). *Astaxanthin process*. Recuperado de <https://www.cyanotech.com/astaxanthin/astaxanthin-process/>
- Damiani, M. (2010). *Haematococcus pluvialis (chlorophyta): biología, ultraestructura y evaluación del contenido lipídico para la obtención de biodiesel*. Tesis doctoral no publicada, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Recuperado de <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2145>
- De Lima, F., Rodríguez de Oliveira, M., Lidório, H., Farias, J., y Martins, L. (2019). Composición química de pétalos de flores de rosa, girasol y caléndula para su uso en la alimentación humana. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(1), 149-158. doi: https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num1_art:1252

- Dhakal, N., Lama, S., Shrestha, A., Bahadur, T. y Mani, P. (2014). Biodiesel From Microalgae: An Overview on Optimization of Different Parameters for Algal Productivity. *Rentech Symposium Compendium*, 4, 35-38. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Nirpesh-Dhakal-2/publication/356065027_Biodiesel_From_Microalgae_An_Overview_on_Optimization_of_Different_Parameters_for_Algal_Productivity/links/618a8eff61f098772074074f/Biodiesel-From-Microalgae-An-Overview-on-Optimization-of-Different-Parameters-for-Algal-Productivity.pdf
- Dutton, J. (2020). *Algae growth and reaction conditions*. Recuperado de <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/694>
- Edifarm. (s.f.) *Fuerza Verde inicio*. Recuperado de https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/FUERZA%20VE RDE%20INICIO-20181018-111758.pdf
- Escuredo, R. (2014). *Evaluación de la biomasa producida por la microalga Haematococcus sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo*. Tesis de maestría no publicada, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. Recuperado de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/126/1/235331.pdf>
- Estamática. (2020). *Kruskal Wallis comparaciones múltiples*. Recuperado de <https://estamatica.net/kruskal-wallis-comparaciones-multiples/>
- Gómez, L., Orozco, M., Quiroga, C., Díaz, J., Huérfano, J., Días, L., Rodríguez, J. y Camacho, J. (2019). Producción de astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7–24. doi: <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>
- Gómez, P., Inostroza, I., Pizarro, M. y Pérez, J. (2013). From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga *Haematococcus pluvialis* with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin. *AoB Plants*, 5, 1-7. doi: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt026>
- González, A., (2015). *¿Qué son las microalgas? Interés y uso*. Recuperado de <https://www.cajamar.es/storage/documents/microalgas-1444391623-ca345.pdf>
- Hanan, N., Al-Shorgani, N., Shukor, H., Abd. Rahman, N. y Kalil, M. (2013). Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluvialis* Growth. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 3(2), 70-73. doi: <https://doi.org/10.18517/ijaseit.3.2.307>
- Hernández, K., Pérez, M., Jáuregui, C., Alcántara, L., y Hurtado, L. (2015). Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003–2013. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(1), 07–16. doi: <https://doi.org/10.4067/s0718-07642015000400001>

- Hitachi High-Tech Analytical Science. (2020). *How to Reduce Errors in Spectroscopy Measurements*. Recuperado de <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=18467>
- Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M. y Petit, T. (2020). Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 1-48. doi:10.3390/jmse8100789
- Jiménez, M. (2017). *Cultivo masivo de la microalga Haematococcus sp. En fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés*. Tesis de maestría no publicada, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. Recuperado de https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1889/1/tesis_Cruz_jim%C3%A9nez_Marco_Antonio_06_dic_2017.pdf
- Karuppan, R., Javee, A., Kannikulathel, S., Pathmanapan, A., Kattusamy, K., Narayanan, V., Ramya, S. y Subramani, N. (2022). Impact of cultivation parameters on astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus lacustris* RRGK isolated from Himachal Pradesh, India. *Energy Nexus*, 6, 1-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100083>
- Khan, M. Shin, J. y Kim, J. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact*, 17, 1-21. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- 1 Lee, C., Jeonb, S., Komc, Y., Lee, H., Geun, D., Woon, S., Choi, Y. (2019). Effects of an auxin-producing symbiotic bacterium on cell growth of the microalga *Haematococcus pluvialis*: Elevation of cell density and prolongation of exponential stage. *Algal Research*, 41, 1-8. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101547>
- Leiton, Y. (2018). *Producción de Haematococcus pluvialis en un bioreactor tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM*. Tesis de grado no publicada, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/4791/TRABAJO%20FINAL%20H%20pluvialis%20c.pdf?sequence=1>
- Liyanaarachchi, V., Nishshanka, G., Premaratne, R., Ariyadasa, T., Nimarshana, P. y Malik, A. (2020). Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports*, 28, 1-11. doi: 10.1016/j.btre. 2020.e00538
- Medhi, J. y Kalita, M. (2021). Astaxanthin: An algae-based natural compound with a potential role in human health-promoting effect: An updated comprehensive

- review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(1), 114-123. doi: 10.7324/JABB.2021.9115
- Merck. (2022). *Cell Culture Contamination Troubleshooting*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-culture-troubleshooting-contamination>
- Metsoviti, M., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. y Katsoulas, N. (2019). Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 31. doi: <https://doi.org/10.3390/plants9010031>
- Misohi. (2016). *Astaxantina*. Recuperado de <https://www.misohinutricion.com/comprar-astaxantina-10-mg-precio.html>
- Montoya, C. y Acosta, A. (2021). Crecimiento de *Tetraselmis* sp. empleando fertilizante como medio de cultivo. *Revista ION*, 34(2), 53-64. doi: <https://doi.org/10.18273/revion.v34n2-2021005>
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*-Multifunctional Applications. *Marine drugs*, 18(9), 459. doi: <https://doi.org/10.3390/md18090459>
- Muñoz, M., Ramírez, J., Otero, A., Medina, V., Cruz, P. y Velasco, Y. (2012). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 438-449. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000300012&lng=en&tlng=es.
- Niño, C., Rodríguez, F., Díaz, L. y Lancheros, A. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>
- Ocaña, M., Pacurucu, R. y Díaz, Y. (2021). Evaluación de la capacidad de algas Chlorophyta para remover materia orgánica en aguas residuales del camal municipal de Shushufindi, Ecuador. *Perfiles*, 1(25), 37-44. doi: 10.47187/perf.v1i25.111
- Oslan, S., Shoparwe, N., Yusoff, A., Rahim, A., Chang, C., Tan, J., Oslan, S., Arumugam, K., Ariff, A., Sulaiman, A. y Mohamed, M. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 1-15. doi: <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Panis, G. y Rosales, J. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assesment all through production line. *Algal Research*, 18, 175-190. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>

- Pastuzo, M. (2016). *Efectos de los fertilizantes agrícolas en el crecimiento celular y producción de pigmentos y carbohidratos en cultivos de Dunaliella cf. viridis*. Tesis de grado no publicada. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/12118/1/Tesis%20final%20Enero%202016.pdf>
- Pattanaik, A., Behari, I. y Pradhan, D., (2018). Effect of LED Lights on the Growth of Microalgae. *INGLOMAYOR*, 14, 14-24. Recuperado de http://www.utkalbiotech.org/notices-file/notification_1524272743.pdf
- Pereira, S. y Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, 51, 1-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102027>
- Ramírez, M. (2013). *Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift*. Tesis de maestría no publicada, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/20559/300061.2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, L. (2019). *Producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio*. Tesis de grado no publicada, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3709/RODRIGUEZ%20ROMERO%20LAURA%20JOHANNA-.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Rost, E., Perales, S., Carstens y Pérez, L. (2017). Modelado de la Producción de Biomasa Microalgal en un Fotobiorreactor de Burbujeo Anular y Configuración Variable. *Información Tecnológica*. 28(2), 95-104. doi: 10.4067/S0718-07642017000200011
- Sampieri, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2006). *Metodología de la investigación*. México D.F., México: McGraw-Hill
- Sánchez, A. (2019). Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia. *NPunto*. 2(20), 46-58. Recuperado de <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5ddb915d24571NPvolumen20-46-58.pdf>
- Scardoelli-Truzzi, B. y Sipaúba-Tavares, L. (2017). Sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *J. Algal Biomass Utiln*, 8(2), 1-10. Recuperado de <http://storage.unitedwebnetwork.com/files/521/d1fbfa96e8fb930367c3b1fc255861c0.pdf>

- Silva, A. (2016). Evaluación de fertilizantes agrícolas en la productividad de la microalga *Chlorella sorokiniana*. *Agron. Mesoam.* 27(2), 265-275. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.24361>
- Soplín, H. (2015). *Uso del fertilizante foliar 11N8P6K en el aislamiento y cultivo de Scenedesmus sp. (Meyen, 1829) (Chlorophyta: Scenedesmaceae) en condiciones de laboratorio*. Tesis de grado no publicada, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú. Recuperado de https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/5993/Herminio_tesis_titulo_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Stunda, A., Zuteris, M. y Rugele, K. (2018). Sunlight potencial for microalgae cultivation in the mid-latitude región- the Baltic states. *Agronomy Research*, 16(3), 910-916. doi: <https://doi.org/10.15159/AR.18.126>
- Sunlight inside. (2022). *Natural light fundamentally different than artificial light*. Recuperado de <https://www.sunlightinside.com/light-and-health/natural-light-is-fundamentally-different-than-artificial-light/>
- UTEX University of Texas at Austin. (s.f.). *Green House Soil Recipe*. Recuperado de <https://utex.org/products/green-house-soil>
- Waterbury, J. (2006). The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer y E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes* (pp. 1053–1073). Nueva York, Estados Unidos: Springer. doi: 10.1007/0-387-30744-3_38
- Wood, A., Everroad, R. y Wingard, L. (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal culturing Techniques*, 269-285. doi: 10.1016/B978-012088426-1/50019-6
- Yan, R., Ying, X., Lin, Q., Yong, X. y Li, K. (2021). Enhancing algal biomass, lipid and astaxanthin production by mix-cultivation of *Haematococcus pluvialis* with *simplicillium lanosoniveum* DT06. *Research Square*, 1, 1-25. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-180975/v1>

ANEXOS

Anexo 1. Composición del fertilizante Fuerza Verde (500 g) (Edifarm, s.f.).

Composición	Concentración
Nitrógeno (N)	13%
Fósforo (P)	13%
Potasio (K)	45%
Magnesio (Mg)	3.0%
Azufre (S)	0.1%
Boro (B)	0.003%
Hierro (Fe)	0.04%
Cobre (Cu)	0.01%
Manganeso (Mn)	0.04%
Zinc (Zn)	3.0%
Molibdeno (Mo)	0.05%
Fitohormonas	420 ppm

Anexo 2. Porcentaje promedio de los componentes del Extracto de Rosas (De Lima et al., 2019).

Composición	Porcentaje promedio (g 100 g ⁻¹)
Cenizas	0.72 ± 0.008
Extracto etéreo	0.23 ± 0.005
Proteína	1.88 ± 0.042
Fibra bruta	3.20 ± 0.095
Carbohidrato	9.41

Anexo 3. Composición del medio M1B5 (1 L)

Compuesto	Concentración total (g)
Urea	0.44
KNO ₃	1.77
KCl	6.66
MgSO ₄	11.11

Anexo 4. Rango promedio de los tratamientos sin aireación en el día 8.

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	9	33,330
	M1B5S	9	20,000
	ERL	9	5,000
	ERS	9	18,220
	FVL	9	42,330
	FVS	9	46,110
	Total	54	

Anexo 5. Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo sin aireación en la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* en el día 8 de experimentación.

Estadísticos de prueba

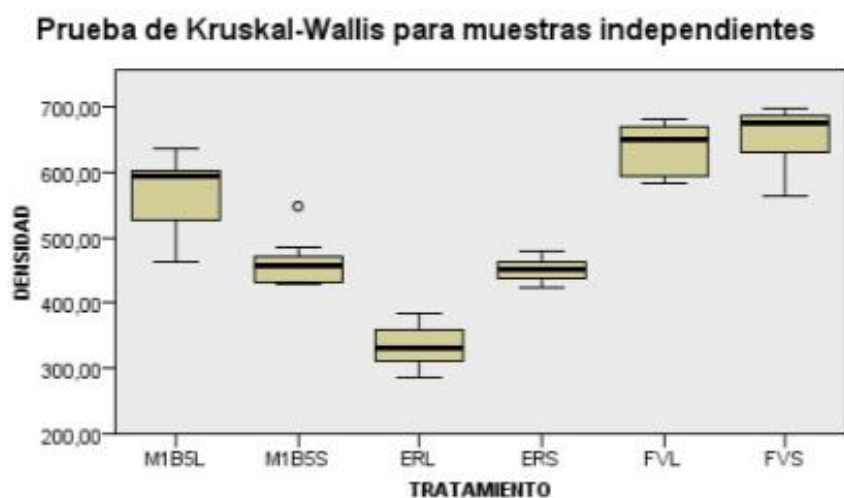
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	45,418
gl	5
Sig. Asintótica	0,000

gl, grados de libertad

Anexo 6. Comparación de la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* entre los medios de cultivo sin aireación en el día 8 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.

Muestra 1 – Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Significación
ERL– ERS	-13,222	7,416	1,000
ERL-M1B5S	15,000	7,416	0,647
ERL-M1B5L	28,333	7,416	0,002
ERL-FVL	-37,333	7,416	0,000
ERL-FVS	-41,111	7,416	0,000
ERS-M1B5S	-1,778	7,416	1,000
ERS-M1B5L	15,111	7,416	0,624
ERS-FVL	-24,111	7,416	0,017
ERS-FVS	-27,889	7,416	0,003
M1B5S-M1B5L	13,333	7,416	1,000
M1B5S-FVL	-22,333	7,416	0,039
M1B5S-FVS	-26,111	7,416	0,006
M1B5L-FVL	9,000	7,416	1,000
M1B5L-FVS	-12,778	7,416	1,000
FVL-FVS	-3,778	7,416	1,000

Anexo 7. Comparación de la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* entre los medios de cultivo sin aireación en el día 8 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.



Anexo 8. Rango promedio de los tratamientos sin aireación en el día 19.

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	9	41,000
	M1B5S	9	50,000
	ERL	9	5,780
	ERS	9	13,220
	FVL	9	32,000
	FVS	9	23,000
	Total	54	

Anexo 9. Prueba no paramétrica de del efecto de los medios de cultivo sin aireación en la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* en el día 19 de experimentación.

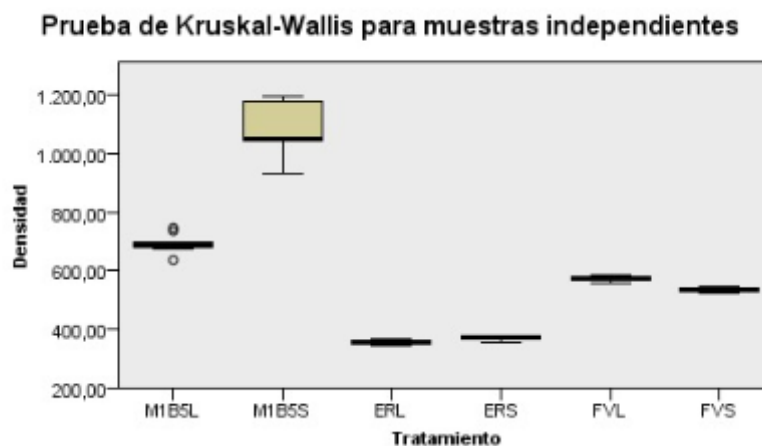
Estadísticos de prueba	
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	51,080
gl	5
Sig. asintótica	0,000

Anexo 10. Comparación de la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* entre los medios de cultivo sin aireación en el día 19 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.

Muestra 1 – Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Significancia
ERL-ERS	-7,444	7,416	1,000
ERL-VFS	-17,222	7,416	0,303
ERL-FVL	-26,222	7,416	0,006
ERL-M1B5L	35,222	7,416	0,000
ERL-M1B5S	44,222	7,416	0,000
ERS-FVS	-9,778	7,416	1,000
ERS-FVL	-18,778	7,416	0,170
ERS-M1B5L	27,778	7,416	0,003
ERS-M1B5S	36,778	7,416	0,000
FVS-FVL	9,000	7,416	1,000
FVS-M1B5L	18,000	7,416	0,228
FVS-M1B5S	27,000	7,416	0,004
FVL-M1B5L	9,000	7,416	1,000
FVL-M1B5S	18,000	7,416	0,228
M1B5L-M1B5S	-9,000	7,416	1,000

M1B5L, M1B5 bajo luz LED; M1B5S, ERL, medio Extracto de Rosas bajo luz LED; ERS, medio Extracto de Rosas bajo luz solar M1B5 bajo luz solar; FVL, medio Fuerza Verde bajo luz LED; FVS, medio Fuerza Verde bajo luz solar.

Anexo 11. Comparación de la densidad celular de la microalga *H. pluvialis* entre los medios de cultivo sin aireación en el día 19 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.



Anexo 12. Rango promedio de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación.

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	5	12,300
	M1B5S	5	16,400
	ERL	5	3,000
	ERS	5	10,500
	FVL	5	23,500
	FVS	5	27,300
	Total	30	

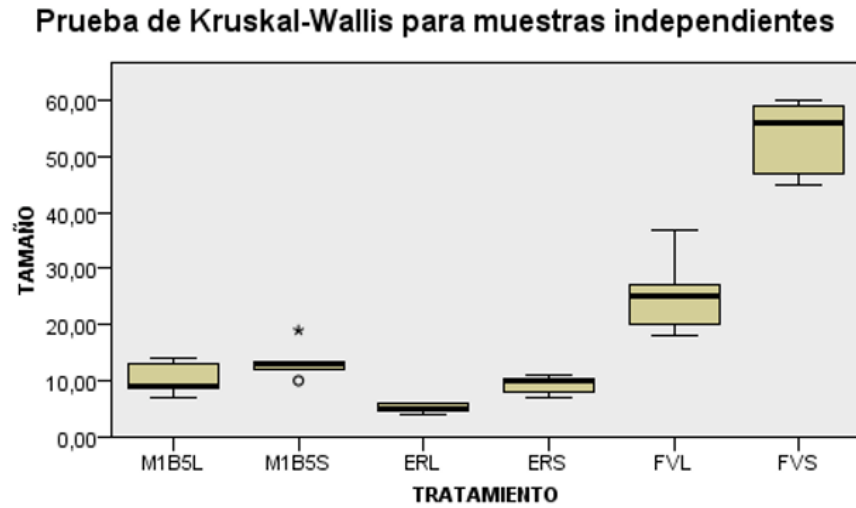
Anexo 13. Prueba no paramétrica de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación.

Estadísticos de prueba	
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	25,593
gl	5
Sig. asintótica	0,000

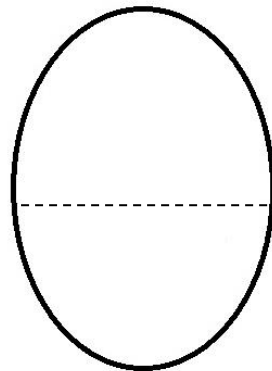
Anexo 14. Comparación de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Significación
ERL-ERS	-7,500	5,560	1,000
ERL-M1B5L	9,300	5,560	1,000
ERL-M1B5S	13,400	5,560	0,239
ERL-FVL	-20,500	5,560	0,003
ERL-FVS	-24,300	5,560	0,000
ERS-M1B5L	1,800	5,560	1,000
ERS-M1B5S	5,900	5,560	1,000
ERS-FVL	-13,000	5,560	0,291
ERS-FVS	-16,800	5,560	0,038
M1B5L-M1B5S	-4,100	5,560	1,000
M1B5L-FVL	-11,200	5,560	0,659
M1B5L-FVS	-15,000	5,560	0,105
M1B5S-FVL	-7,100	5,560	1,000
M1B5S-FVS	-10,900	5,560	0,749
FVL-FVS	-3,800	5,560	1,000

Anexo 15. Comparación de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos sin aireación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis representado en un gráfico de cajas y bigotes.



Anexo 16. Referencia de la medida del diámetro de la microalga *H. pluvialis*



Anexo 17. Rango promedio de los tratamientos con aireación en el día 11

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	6	15,500
	M1B5S	6	9,500
	FVL	6	3,500
	FVS	6	21,500
	Total	24	

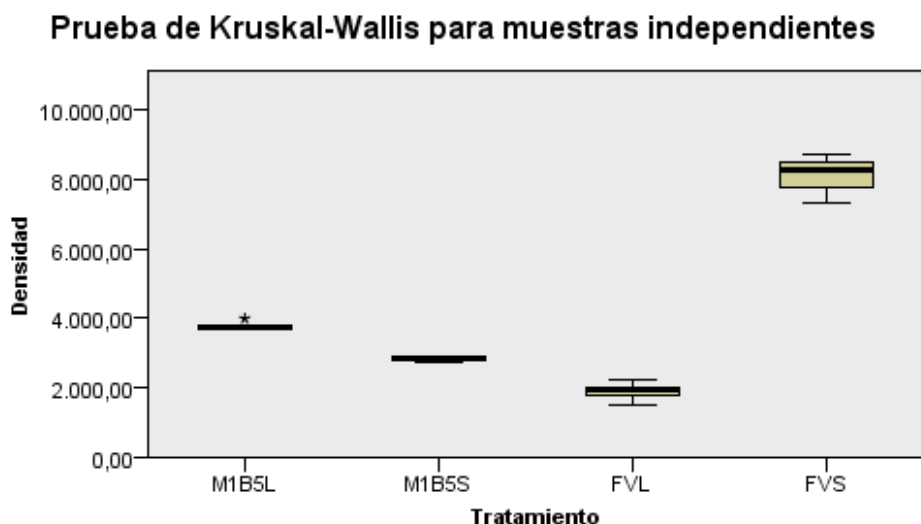
Anexo 18. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo con aireación en la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* en el día 11 de experimentación.

Estadísticos de prueba	
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	21,609
gl	3
Sig. asintótica	0,000

Anexo 19. Comparación de la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* entre los medios de cultivo con aireación en el día 11 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de Contraste	Significación
FVL-M1B5S	6,000	0,849
FVL-M1B5L	12,000	0,020
FVL-FVS	-18,000	0,000
M1B5S-M1B5L	6,000	0,849
M1B5S-FVS	-12,000	0,020
M1B5L-FVS	-6,000	0,849

Anexo 20. Comparación de la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* entre los medios de cultivo con aireación en el día 11 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes.



Anexo 21. Rango promedio de los tratamientos con aireación en el día 14.

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	6	9,500
	M1B5S	6	3,500
	FVL	6	15,500
	FVS	6	21,500
	Total	24	

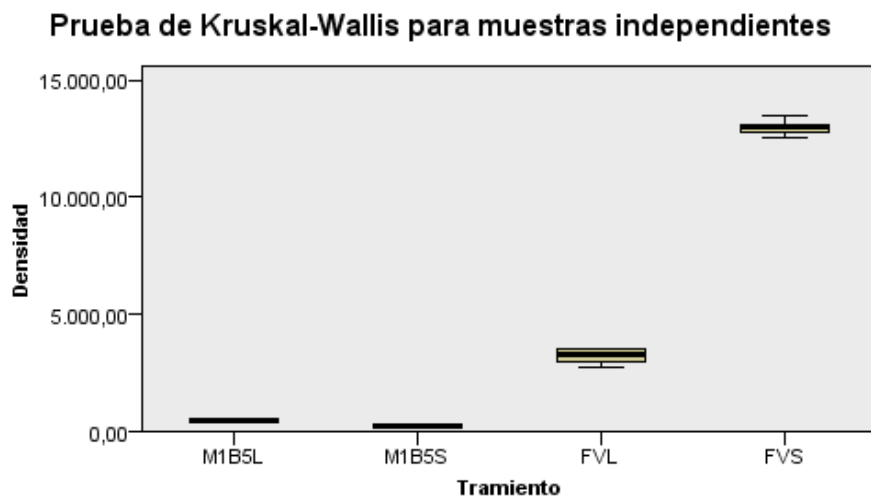
Anexo 22. Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis del efecto de los medios de cultivo con aireación en la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* en el día 14 de experimentación.

Estadísticos de prueba	
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	21,609
gl	3
Sig. Asintótica	0,000

Anexo 23. Comparación de la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* entre los medios de cultivo con aireación en el día 14 de experimentación mediante la prueba post hoc de Kruskal-Wallis.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Significación
M1B5S-M1B5L	6,000	4,082	0,849
M1B5S-FVL	-12,000	4,082	0,020
M1B5S-FVS	-18,000	4,082	0,000
M1B5L-FVL	-6,000	4,082	0,849
M1B5L-FVS	-12,000	4,082	0,020
FVL-FVS	-6,000	4,082	0,849

Anexo 24. Comparación de la densidad celular de la microalga *Haematococcus pluviialis* entre los medios de cultivo con aireación en el día 14 de experimentación representado en un gráfico de cajas y bigotes



Anexo 25. Rango promedio de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos con aireación.

	Tratamiento	N	Rango promedio
Densidad	M1B5L	5	8,800
	M1B5S	5	9,200
	FVL	5	10,700
	FVS	5	13,300
	Total	20	

Anexo 26. Prueba no paramétrica de los tamaños celulares de la microalga en los tratamientos con aireación.

Estadísticos de prueba	
	Densidad
H de Kruskal-Wallis	1,986
gl	3
Sig. Asintótica	0,575