



Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la producción del pigmento astaxantina.

Erica Johana Quintero Gómez

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Bacteriología y laboratorio clínico
Bioprocesos y control
2020**

Introducción

Organización de las Naciones Unidas

80% de las aguas residuales son vertidas en ríos, cuencas y mares.

Contaminación

- Compuestos orgánicos e inorgánicos
- Virus
- Bacterias
- Parásitos
- Compuestos químicos
- Hormonas

Impacto en la salud humana y el medio ambiente



Fuente: Consultoría ambiental Cali
Colombia biota ingeniería

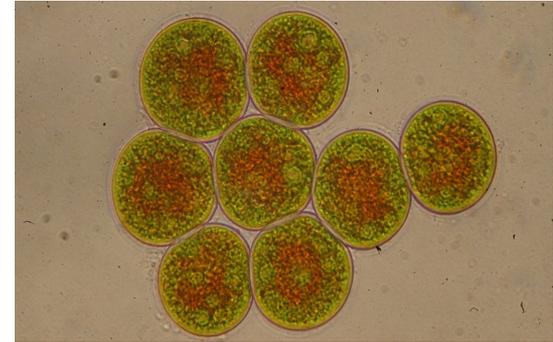
Introducción

Haematococcus pluvialis es una microalga verde de agua dulce y la mejor productora natural de astaxantina acumulando hasta el 4% de su peso seco.

Astaxantina es un pigmento carotenoide que se caracteriza por:

- Grado alimenticio
- Capacidad antioxidante

Uso en la industria farmacéutica, acuicultura y alimentaria.



Fuente: Algae analytics



Fuente: Boronat

Aguas residuales

Por el uso del ser humano representan un peligro y deben ser tratadas y desechadas debido a la elevada concentración de sustancias y microorganismos presentes.

Composición:
Materia orgánica e inorgánica
Entidades biológicas como bacterias y virus, reflejo de los estilos de vida de la sociedad.



Fuente: purewater.com.co

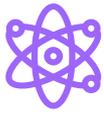
Aguas residuales

Aguas residuales domésticas

Proviene de desechos de origen humano o animal como heces y orina, residuos por limpieza del hogar y de aseo personal con pocas concentraciones de sólidos orgánicos e inorgánicos suspendidos y disueltos.

Aguas residuales porcinas

Proveniente de la cría de cerdos está conformada por heces, orina, residuos de comida y agua utilizada para la limpieza de la zona de criadero por lo que la eliminación de la materia orgánica, del nitrógeno y fósforo.



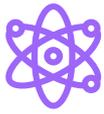
Características

Físicas

- Color:** negro o gris representativo del tiempo de descarte.
- Olor:** descomposición de materia orgánica con la producción de gases.
- Temperatura:** 10 a 21°C.
- Sólidos totales:** suspendidos y filtrables.

Químicas

- Orgánica:** combinación de C, H, O y N.
Proteínas, lípidos, carbohidratos, orina, excremento y restos de alimentos.
- Inorgánica:** altas concentraciones de nitrógeno y fósforo.
Metales pesados como zinc, cobre y mercurio.



Características

Microbiológicas

- Bacterias:** *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*.
- **Virus:** Adenovirus, Rotavirus, Virus de la hepatitis A y Virus de la hepatitis E, Norovirus, SARS- CoV-2.
- Parásitos:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Ascaris*, *Taenia*, *Entamoeba*.

Contaminantes emergentes

- Farmacos:** antidepresivos, antiretrovirales, analgésicos, antiinflamatorios, agentes ansiolíticos, medicamentos antidiabéticos, diuréticos, antibióticos, antiepilépticos, broncodilatadores y hormonas.

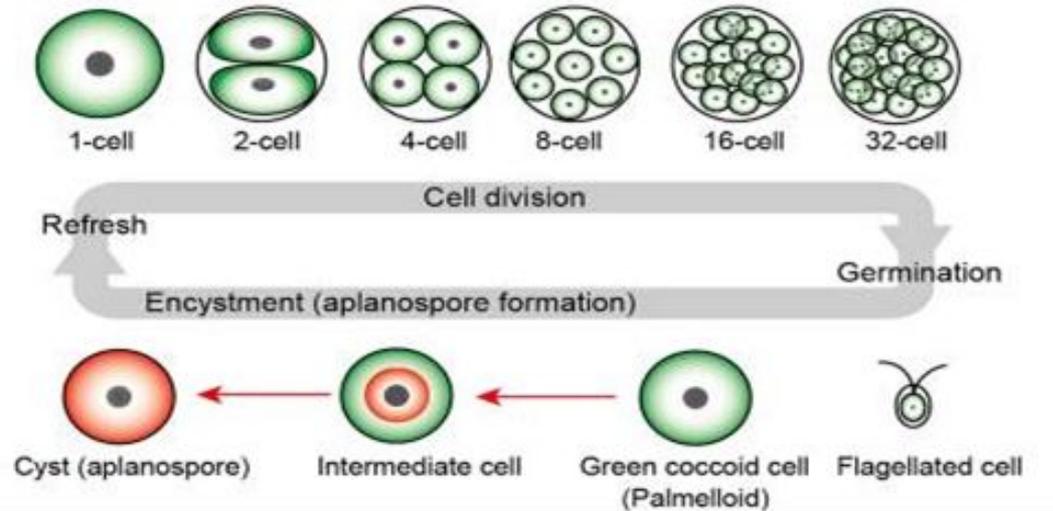
Haematococcus pluvialis

Microalga verde unicelular, fotosintética de agua dulce. Mejor fuente natural de astaxantina.

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: *Haematococcaceae*.



Ciclo de vida de *H. pluvialis*. Fuente:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848535/#B72>

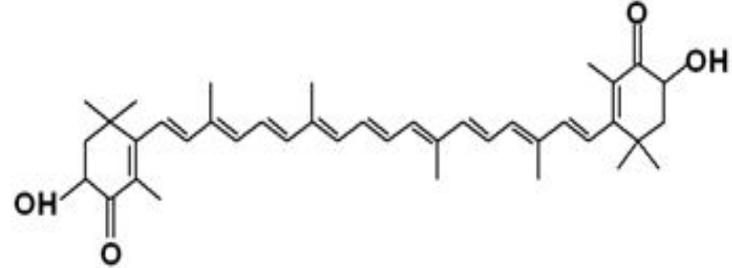


Astaxantina

Carotenoide con amplias aplicaciones a nivel de:

- Industrias farmacéuticas
- Cosméticas
- Alimenticias
- Médicas y nutraceuticas

Elimina radicales libres
función antioxidante y
cardioprotectoras, antidiabéticas
y neuroprotectoras.



Estructura química de la astaxantina.

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917265/>

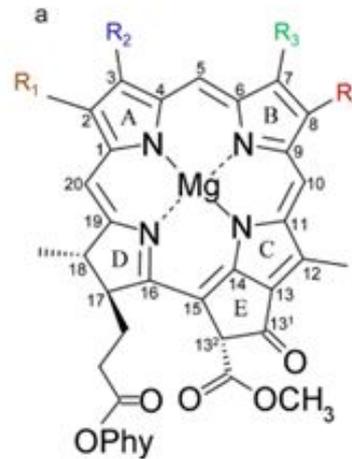
Otras fuentes: *Chlorella zofingiensis*,
Corynebacterium glutamicum,
Paracoccus carotinifaciens,
Xanthophyllomyces dendrorhous,
Rhodotorula glutinis, *Candida utilis*,
Rhodospiridium sp., *Sporobolomyces sp.*

Clorofila

Pigmento verde natural comercialmente importante, responsable de la absorción de energía luminosa y su conversión en energía química.

Utilizado en:

- Industrias alimenticias
- Cosméticas
- Farmacéuticas



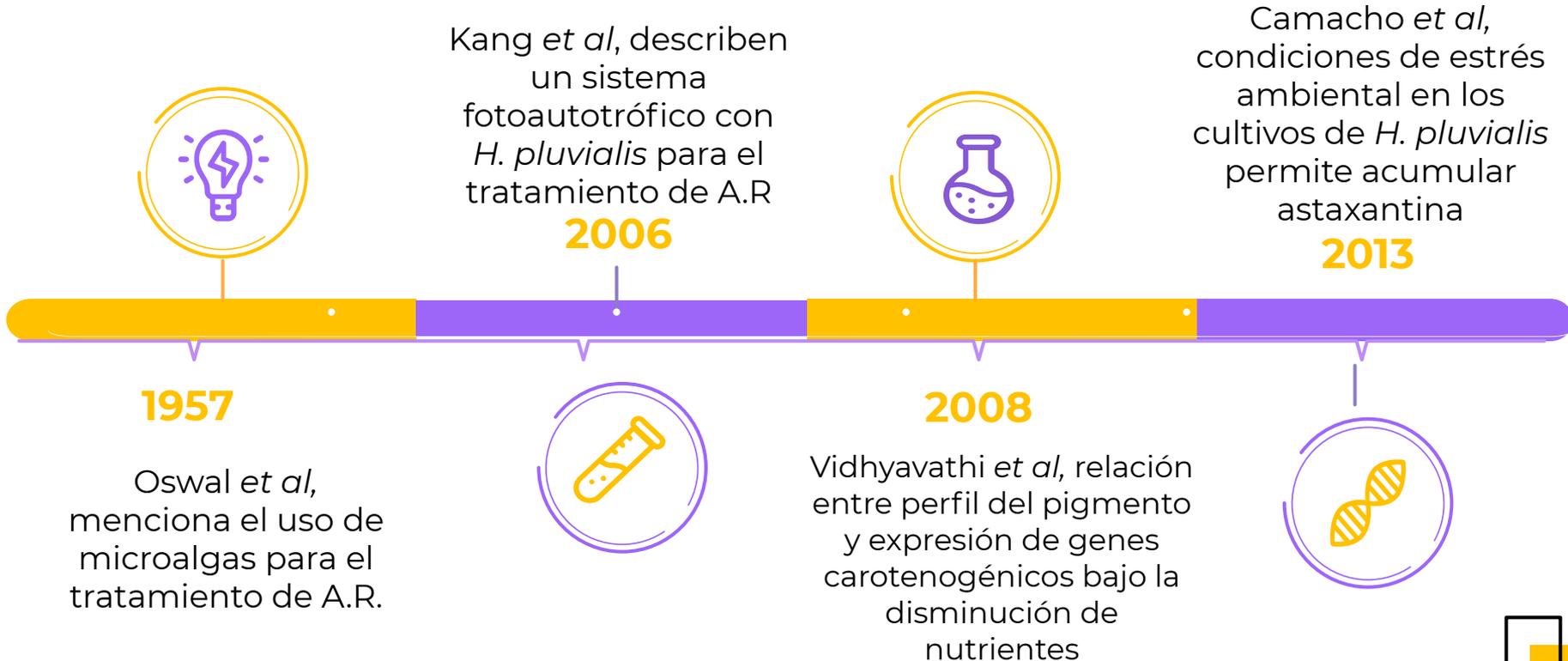
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
chlorophyll a	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
chlorophyll b	CH ₃	CH=CH ₂	CHO	CH ₂ -CH ₃
chlorophyll d	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
chlorophyll f	CHO	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
8-vinyl chlorophyll a	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂

Estructura química de la clorofila.

Fuente:<https://www.nature.com/articles/srep06069>



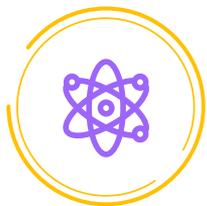
Antecedentes



Antecedentes

Guang *et al*, microalgas en el tratamiento de A.R asimilan el N y P para su crecimiento y elimina contaminantes orgánicos y metales pesados.

2014



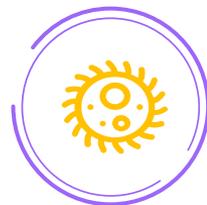
2015

Sato *et al*, los resultados evidencian al A.R.D como medio para el cultivo de *H. pluvialis* teniendo una tasa de crecimiento mayor que en el medio convencional.



2016

Ledda *et al*. suspensión de A.R.P, funcionando como sustrato para *H. pluvialis* y la producción de biomasa.



2018

Chew *et al*, las aguas residuales son una fuente de gran potencial para el cultivo de las microalgas.

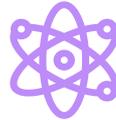


Planteamiento del problema



Contaminación

Descargas de aguas residuales



Valor nutricional

Crecimiento de microalgas



Recurso amigable

Disminuir efectos nocivos y costos

¿por qué las aguas residuales pueden resultar ser un medio de cultivo ideal para el crecimiento de *H. pluvialis*?





Objetivos

Objetivo general

Evaluar un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y porcinas para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la obtención del pigmento astaxantina.

Objetivos específicos

- Identificar las características de las aguas residuales domésticas y porcinas mediante revisión bibliográfica.
- Establecer las condiciones necesarias para la producción de *Haematococcus pluvialis* y astaxantina en el medio de cultivo a partir de aguas residuales de origen doméstico y porcino.
- Evaluar el crecimiento del alga y la producción de clorofila y astaxantina en el medio de cultivo de aguas residuales domésticas y porcinas.

Metodología

Tipo de investigación

Proceso cualitativo y cuantitativo.



Alcance

Exploratorio, explicativo y descriptivo.



Población

Aguas residuales



Muestra

Aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas.



Metodología

Variable dependiente

Crecimiento celular de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina.



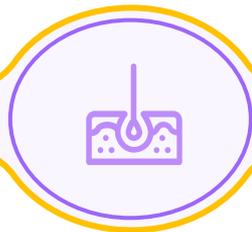
Indicadores

Composición A.R.
Nutrientes.
Condiciones ambientales.



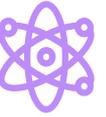
Variable independiente

Cepas UA y UTEX 2505 de *H. pluvialis* y los medios de cultivo.



Método utilizado





Método utilizado

Técnicas y procedimientos



Microorganismo



Preinóculo

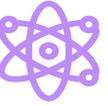


Muestras de agua residual



Medios de cultivo





Método utilizado

Crecimiento celular

18:6 h con lámparas de luz blanca a 689 luxes. Temperatura ambiente por 29 días.

Conteo celular



Producción de astaxantina

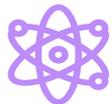
20:4 h con lámparas de luz blanca en promedio a 22.512 luxes. Temperatura ambiente por 20 días.

Extracción de clorofila y astaxantina



Cuantificación de astaxantina





Método utilizado

Cambios
morfológicos

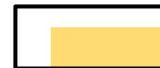


Control de
calidad



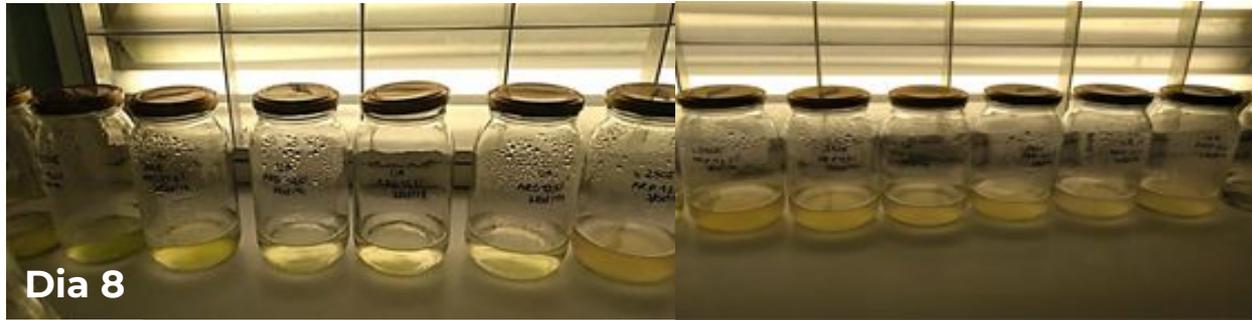
Análisis
estadístico

Análisis de varianza ANOVA de dos factores (medios de cultivo y cepas) con varias muestras por grupo 95% de confianza.



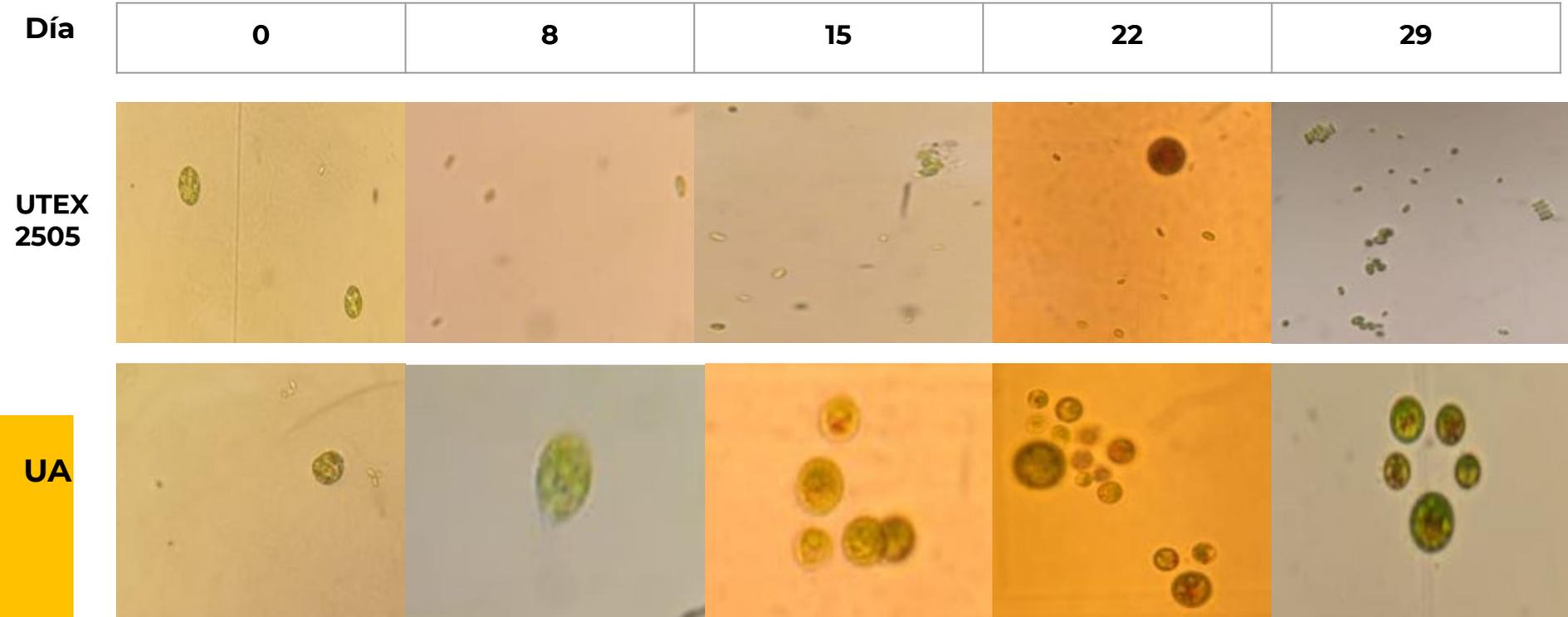
Resultados

Fase de crecimiento celular

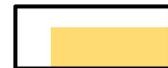


Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 15. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

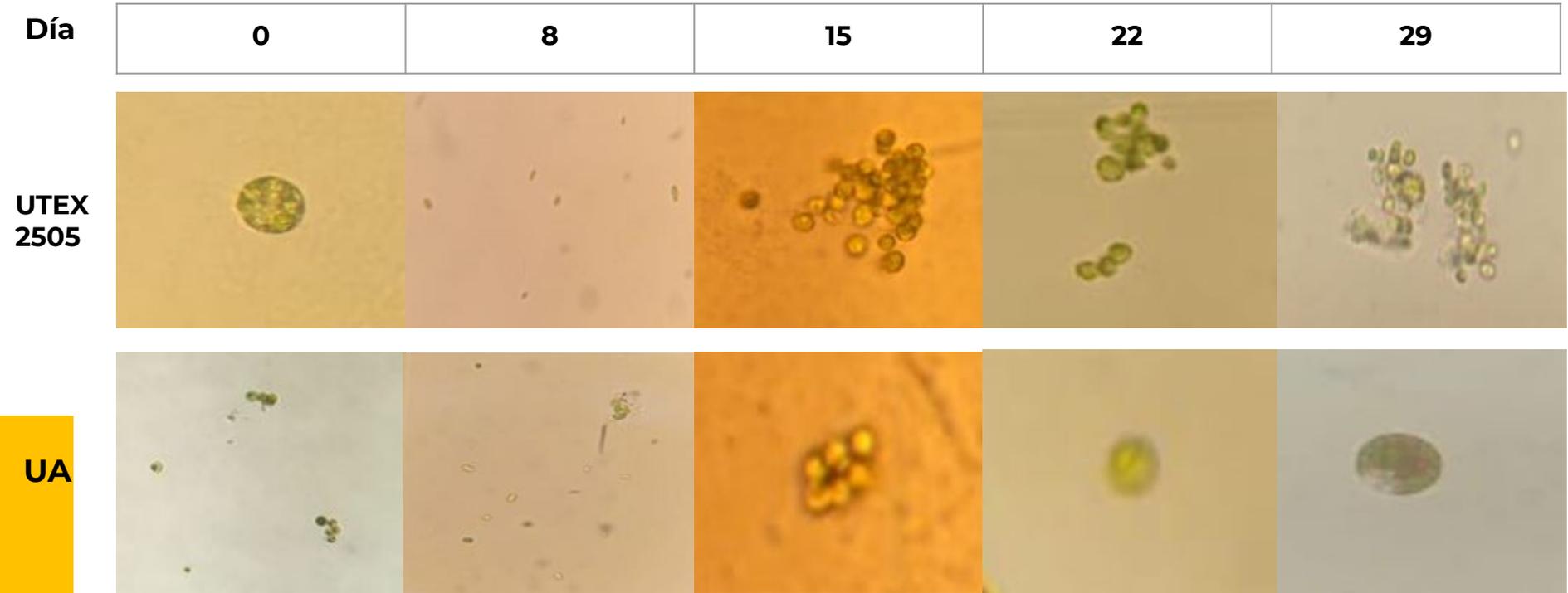
Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de crecimiento.



Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.



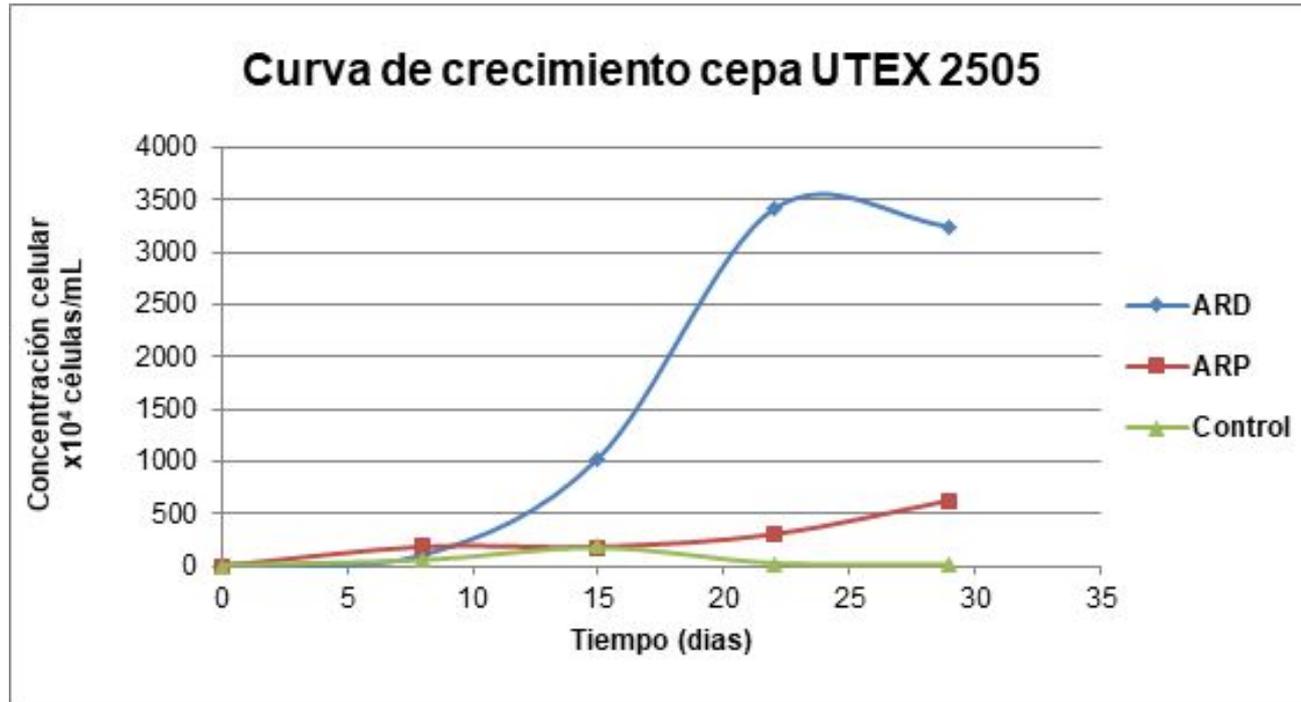
Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de crecimiento.



Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

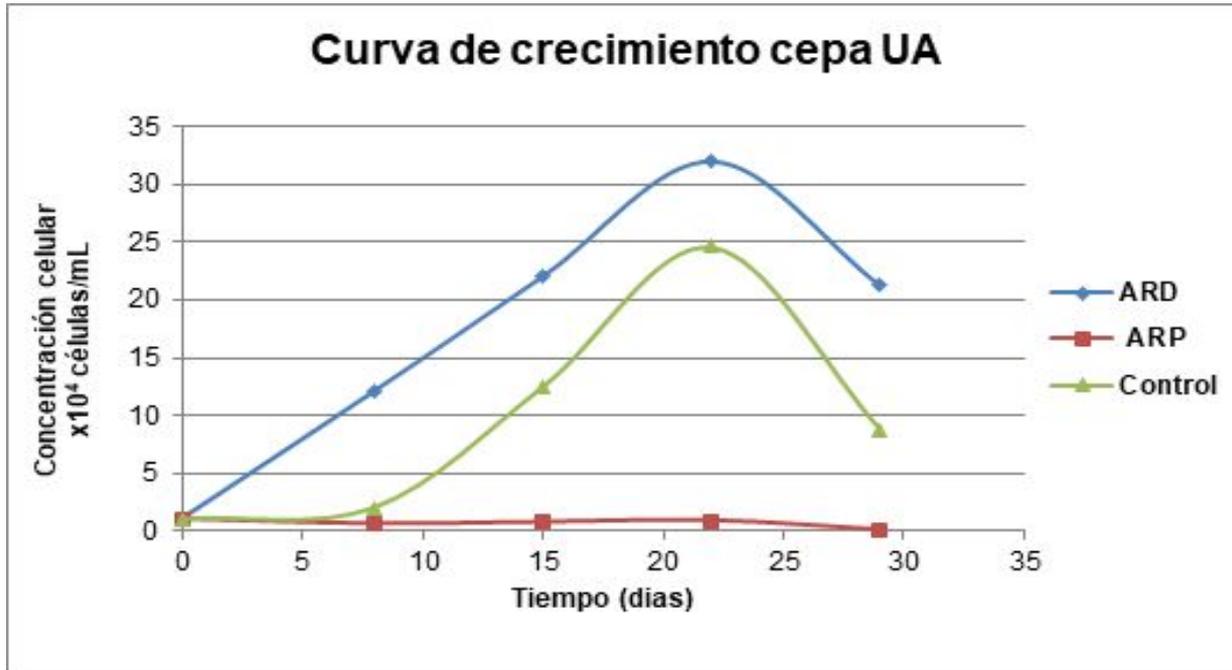


Cinética de crecimiento de *Haematococcus pluvialis*.



Curva de crecimiento de la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5%. Construcción propia, Quintero E. 2019

Cinética de crecimiento de *Haematococcus pluvialis*.



Curva de crecimiento de la cepa UA de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5%. Construcción propia, Quintero E. 2019

Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los medios de cultivos y cepas de *H. pluvialis* evaluadas

Medios de cultivo y cepas	No. datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
Agua residual doméstica – UTEX 2505	5	4	7,532	0,029	85%
Agua residual doméstica – UA	5	4	5,506	0,023	68%
Agua residual porcina – UTEX 2505	5	4	6,792	0,030	87%
Agua residual porcina - UA	5	3,079	4	0,016	49%

Nota: construcción propia, Quintero E. 2020

Análisis de varianza

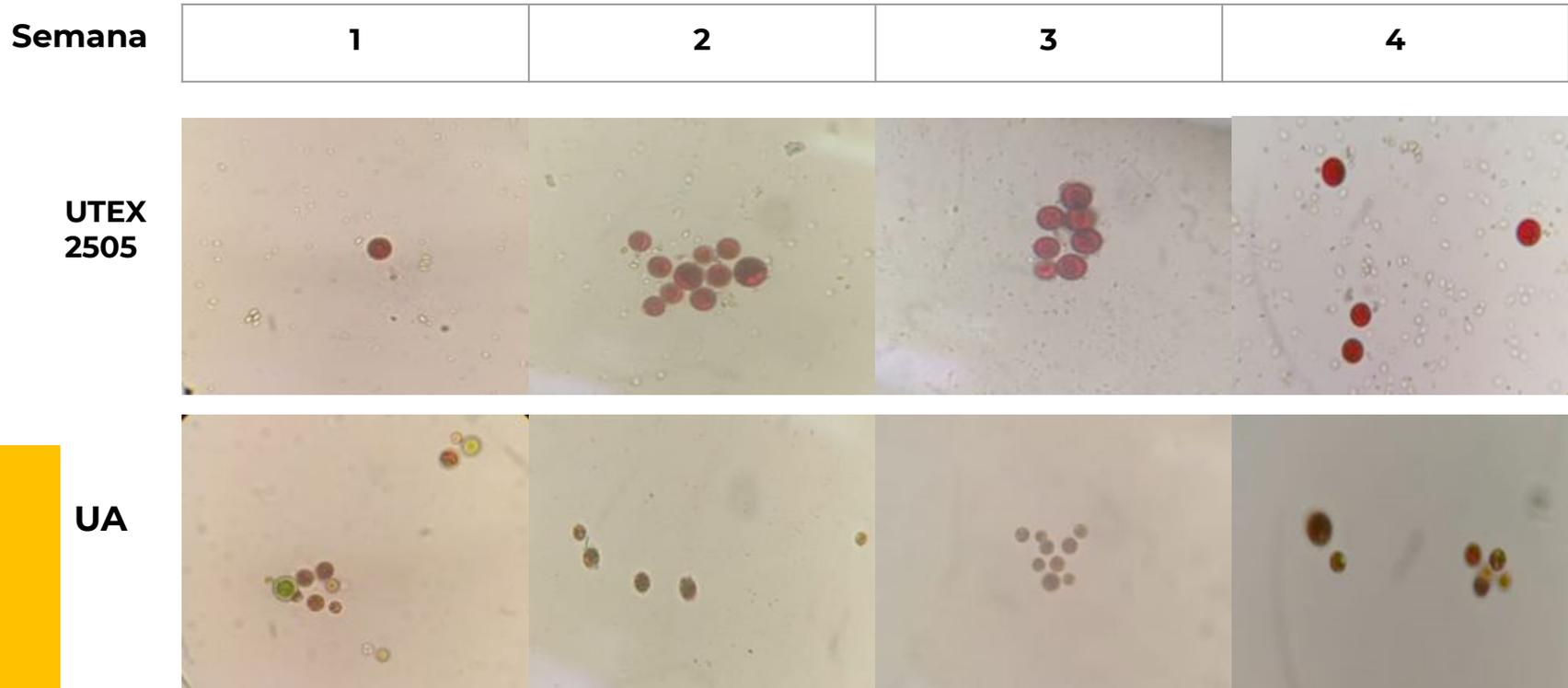
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Cepas de H.				5,67837	0,02991	
<i>pluvialis</i>	4014205,4	1	4014205,441	2	7	4,493998
Medios de cultivo				3,04774	0,10001	
	2154541,1	1	2154541,11	7	8	4,493998
Interacción				2,89251	0,10834	
	2044801,2	1	2044801,25	3	2	4,493998
Dentro del grupo	11310862,6	16	706928,9151			
Total	19524410,4	19				

Fase de estrés celular



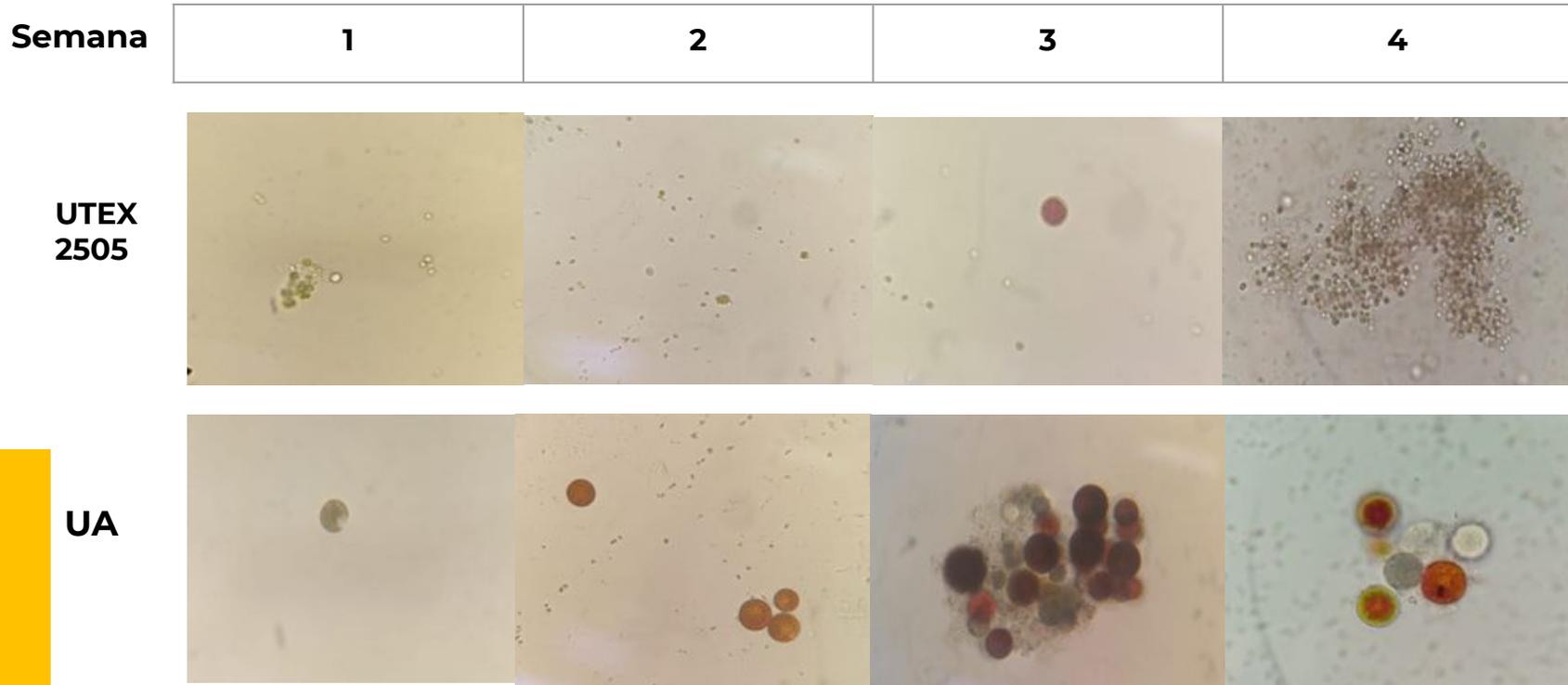
Medios de cultivo A.R.D y A.R.P en fase de estrés celular. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de estrés.



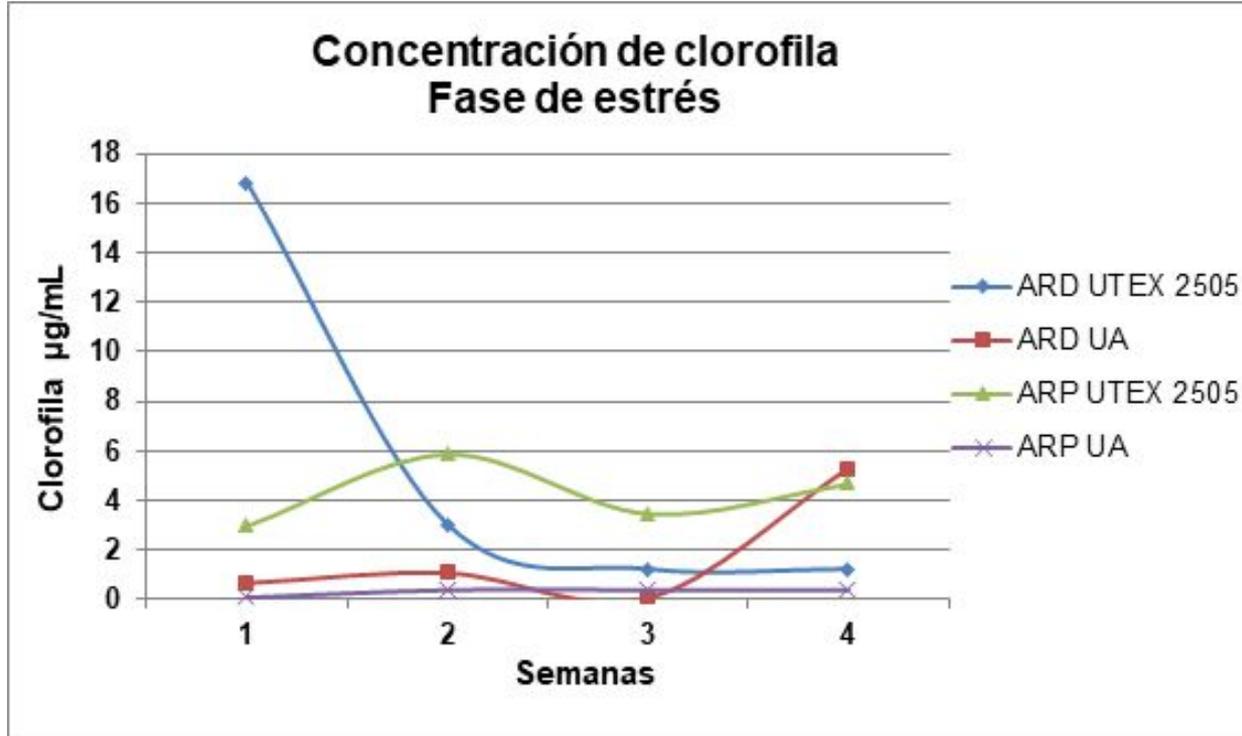
Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas . Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de estrés.



Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas . Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

Determinación de clorofila

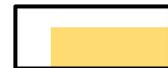


Concentración de clorofila durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2020

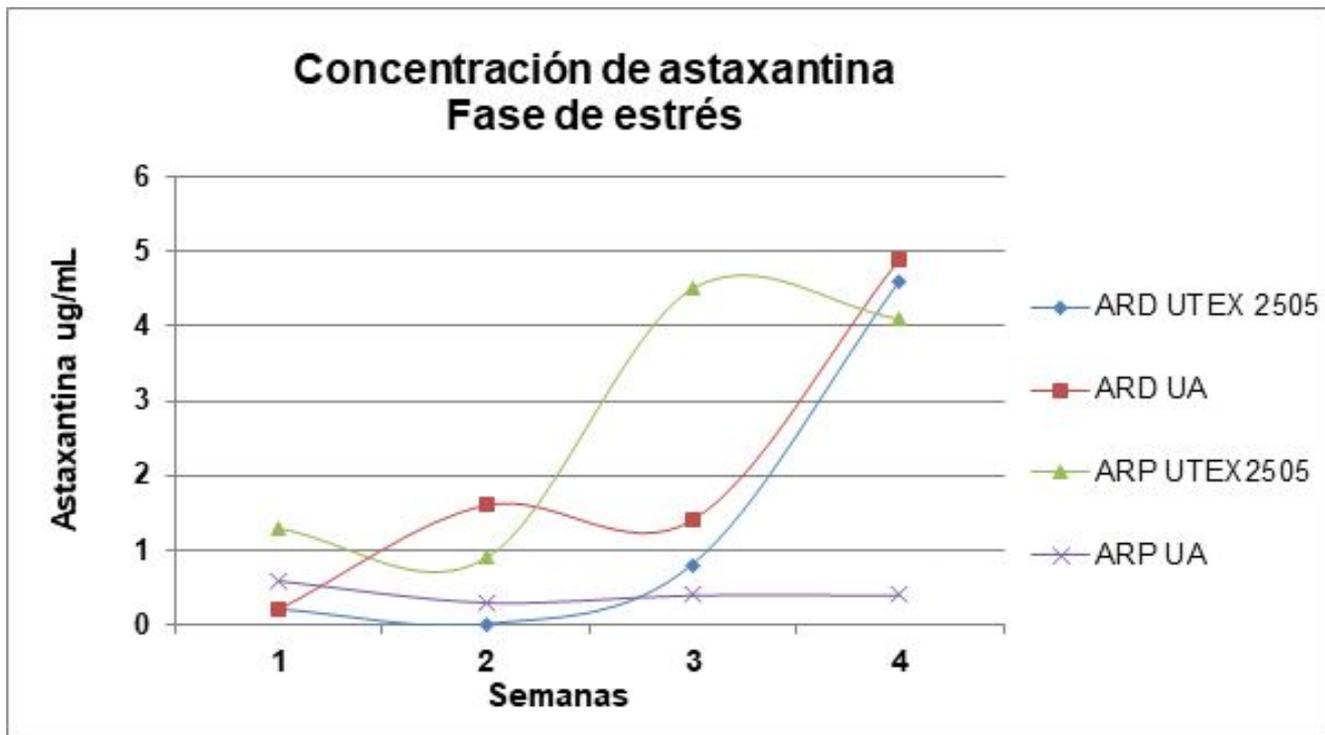
Cuantificación de astaxantina durante la fase de estrés por espectrofotometría

Medios y cepas	Concentración de astaxantina ug/mL			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
A.R.D UTEX 2505	0,2	0	0,8	4,6
A.R.D UA	0,2	1,6	1,4	4,9
A.R.P UTEX 2505	1,3	0,9	4,5	4,1
A.R.P UA	0,6	0,3	0,4	0,4

Agua residual domestica (A.R.D), Agua residual porcina (A.R.P). Construcción propia, Quintero E. 2020



Determinación de astaxantina

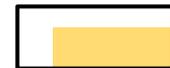


Concentración de astaxantina durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2020

Cuantificación de astaxantina durante la fase de estrés por HPLC

Medio de cultivo y cepa	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
A.R.D UTEX 2505	5,401
A.R.D. UA	27,091
A.R.P UTEX 2505	5,386
A.R.P UA	17,056

Agua residual domestica (A.R.D), Agua residual porcina (A.R.P).
Construcción propia, Quintero E. 2020



Discusión

Importancia ambiental de las aguas residuales.



Medio de cultivo:
Contenido nutricional
Fácil acceso y bajo costo.



Fase de crecimiento de *H. pluvialis*

Macro y micronutrientes disponibles.



Discusión

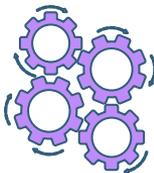
Kang *et al.*,
0,239 células/
día A.R tratada
y 0,245
células/día
A.R.P.

Sato *et al.*, 0,34
células/día en
Agua residual
filtrada.



UTEX 2505 y UA fue de 0,029 y
0,023 células/día
respectivamente.

-Posible inhibición del
crecimiento celular.



Discusión

Wu *et al.*,
obtuvieron una
densidad máxima
de $8,5 \times 10^4$
células/mL de *H.*
pluvialis.

Densidad celular con medio
a partir de aguas residuales
domésticas, la cepa UTEX
2505 fue representativa con
 3409×10^4 células/ ml.



Asimilación de
nitrógeno y fósforo
disponible.



Discusión

Kang *et al.*, la clorofila y crecimiento celular disminuyeron por el agotamiento del nitrato disponible.

Zhu *et al.*, degradación de membranas tilacoidales durante enquistamiento, logra la descomposición de la clorofila *a* y *b*.

Mascia *et al.*, la maquinaria fotosintética se reorganiza por aumento de luz. Reduce el volumen de los cloroplastos, los tilacoides y desestabiliza los fotosistemas I y II.

Luz continua en la fase de estrés celular, dio lugar a aplanosporas acumulando astaxantina.

La cuantificación de clorofila mostró una disminución desde la semana 1 a 4 en los dos medios de cultivo .



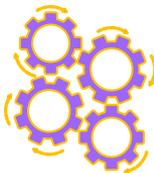
Discusión

La acumulación de astaxantina en las aplanosporas de *H. pluvialis* durante el estrés celular aumentó en los medios de cultivo.

Discrepancias en resultados por la sensibilidad de cada técnica.
HPLC: metodología bajo ausencia de luz, control de temperatura y aireación.

Kang *et al.*, en medios a partir de agua residual doméstica tratada con resultados de astaxantina de 39,7 mg/ L y 42,3 mg/L.

Ledda *et al.*, con medio de cultivo a partir de A.R.P obtuvo concentración final de astaxantina menor que las obtenidas por Kang. Manejo de baja irradiancia.



Conclusiones

- El agua residual doméstica y agua residual porcina representan un potencial factor de contaminación al ser vertidas en otras fuentes.
- El cultivo de *H. pluvialis* en aguas residuales domésticas y porcinas, permitió producir astaxantina. En la fase inicial se proporcionan las condiciones ideales para el crecimiento de la microalga y la segunda fase buscó generar condiciones estresantes en el medio.
- Los resultados de la investigación demostraron que las dos cepas de *H. pluvialis*, asimilaron los componentes de las aguas residuales domésticas y porcinas proporcionadas en los medios de cultivo.



Conclusiones

- La concentración de clorofila y astaxantina se determinó aplicando técnica espectrofotométrica y de HPLC. Los valores de clorofila disminuyeron progresivamente desde la fase de estrés celular y simultáneamente la astaxantina incrementó.
- La concentración final de astaxantina fue mayor con la cepa UA de *H. pluvialis* en el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas, obteniéndose mediante la técnica espectrofotométrica 4,9 ug/mL y por cromatografía líquida de alta eficiencia 27,091 ug/mL.
- Los resultados de este estudio apoyan la idea de obtener pigmentos de gran valor comercial, mediante la utilización de las aguas residuales domésticas y porcinas.



IX Semilleros & Grupos VI



ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
74 AÑOS
OFICINA DE INVESTIGACIONES

Certifica que:

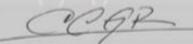
Erica Johana Quintero Gómez

Con documento: 1073428531

Participó en el "IX Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación y VI Encuentro Institucional de Grupos de Investigación: Visibilidad e Internacionalización en la Investigación", realizado en la ciudad de Bogotá, los días 22, 25 y 26 de noviembre de 2019, en calidad de:

PONENTE

Con el póster: Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la producción del pigmento astaxantina.



Claudia Consuelo González
Directora Oficina de Investigaciones



EL COORDINADOR REDCOLSI NODO BOGOTÁ – CUNDINAMARCA

CERTIFICA QUE:

Las personas relacionadas a continuación participaron en el XVIII ENCUENTRO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN del 24 al 28 de agosto de 2020 en la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (Bogotá D.C.).

VII Encuentro Institucional de Grupos de Investigación y X Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
75 AÑOS
OFICINA DE INVESTIGACIONES

Hace constar que:

Érica Johana Quintero Gómez

Con documento: 1073428531

Participó como **PONENTE**, con la ponencia titulada "Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y porcinas para el crecimiento de *Haematococcus Pluvialis* y producción de Astaxantina."

En el "VII Encuentro Institucional de Grupos de Investigación y X Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación - Contexto y Oportunidades para la Transferencia de Conocimiento" realizado de manera virtual en la ciudad de Bogotá, los días 6, 7, 8 y 9 de octubre del año 2020, con una intensidad horaria de 15 horas.



Freddy Chacón Chacón
Jefe Oficina de Investigaciones

VII Encuentro Institucional de Grupos de Investigación y X Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
75 AÑOS
OFICINA DE INVESTIGACIONES

Hace constar que el trabajo titulado:

Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y porcinas para el crecimiento de *Haematococcus Pluvialis* y producción de Astaxantina.

De las autoras **Érica Johana Quintero Gómez** 1073428531
Ana Graciela Lancho Díaz 41723631

Perteneciente al semillero de investigación *Bioprocesos y Control*

Se presentó en el "VII Encuentro Institucional de Grupos de Investigación y X Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación - Contexto y Oportunidades para la Transferencia de Conocimiento" realizado de manera virtual en la ciudad de Bogotá, los días 6, 7, 8 y 9 de octubre del año 2020, con una intensidad horaria de 15 horas.



Freddy Chacón Chacón
Jefe Oficina de Investigaciones