



**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE  
CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**MÁSTER EN HORTICULTURA MEDITERRÁNEA BAJO  
INVERNADERO**

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOFERTILIZANTES EN ESTANQUE AIREADO**

**OPTIMIZATION OF PRODUCTION OF MICROALGAE FOR THE PRODUCTION  
OF BIOFERTILIZERS IN AERATED POND**

**EFECTO DE LA RADIACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE  
BIOMASA DE *SCENEDESMUS SP* PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOFERTILIZANTES VEGETALES**

**RADIATION EFFECT ON PRODUCTION AND QUALITY OF *SCENEDESMUS SP*  
BIOMASS FOR THE PRODUCTION OF PLANTS BIOFERTILIZERS**

**ALUMNO: GUSTAVO CEBRIÁN CASTILLO.**

**DIRECTOR: JOSÉ MIGUEL GUZMÁN PALOMINO.**

**CURSO 2014/2015, CONVOCATORIA SEPTIEMBRE 2015**

# **Efecto de la radiación sobre la producción y calidad de biomasa de *Scenedesmus sp* para la obtención de biofertilizantes vegetales**

Radiation effect on production and quality of *Scenedesmus sp* biomass for the production of plants biofertilizers

**Cebrián, G<sup>1</sup> and Guzmán, M<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía, CITE 2B, Universidad de Almería, 04120, Almería, España.

<sup>1</sup>Department of Agronomy, CITE 2B, University of Almeria, 04120, Almeria, Spain.

e-mail: [gcc287@inlumine.ual.es](mailto:gcc287@inlumine.ual.es)

## **RESUMEN**

Las especies de microalgas ven estimulada su actividad metabólica bajo distintos factores fisicoquímicos. La luz es el factor más importante, actuando sobre la estimulación selectiva de los centros captadores de luz, induciendo respuestas sobre su crecimiento y desarrollo y con ello la producción de biomasa. En este estudio se ha evaluado la especie *Scenedesmus sp* y su respuesta ante diferentes radiaciones LEDs monocromáticas sobre su crecimiento y desarrollo celular, importante para la producción de biomasa de interés en su uso agrícola. La microalga se inoculó el 27 de julio de 2015, con medios de cultivo BG-11. Tras una primera fase de crecimiento en condiciones controladas, se realizó varios escalados en erlenmeyer hasta un volumen final de 300 ml, utilizando 3 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en iluminación complementaria con LEDs monobanda de emisión en azul, blanco, rojo y un tratamiento control irradiado ambientalmente. Se tomaron muestras periódicas de los distintos tratamientos diariamente para determinar la biomasa producida, densidad celular y velocidad de crecimiento del cultivo. Las muestras se correlacionaron con valores de densidad óptica del medio, medidas por absorbancia a 750 nm. Se observó un aumento considerable en la producción de biomasa en cultivos irradiados con luz roja (16.55 g/l) frente a la producida bajo luz azul (12.95 g/l), blanca (14.96 g/l) y control (9.04 g/l). La densidad celular mayor en los cultivos suplementados con luz azul ( $5.29 \cdot 10^{12}$  Cél/ml), mientras que el mayor peso celular se consiguió en el tratamiento control. Los resultados de este estudio muestran que las condiciones de radiación en paquetes específicos potencian de manera diferencial el comportamiento del cultivo de microalgas, actuando sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo celular, de tal manera que una combinación de los efectos en periodos adecuados del ciclo pueden asegurar mayores producciones que las conseguidas de forma aislada.

**Palabras clave:** radiación, LEDs, crecimiento, biomasa.

## **ABSTRACT**

Microalgae species are their metabolic activity stimulated various physicochemical factors. Light is the most important factor acting on the selective stimulation of the centers of light sensors, inducing responses on their growth and development and thus the production of biomass. This study evaluated the species *Scenedesmus sp* and its response to different monochromatic LEDs radiation on cell growth and development, important for biomass production interest in agricultural use. The microalgae inoculated the July 27, 2015, with growth media BG-11. After an initial growth phase under controlled conditions, various scaled erlenmeyer was performed in a final volume of 300 ml, using 3 replicates per treatment. Treatments consisted of supplemental lighting with single-band emission LEDs in blue, white, red and environmentally irradiated control treatment. Periodic samples of the different treatments were taken daily to determine the biomass produced, cell density and growth rate of the culture. The samples are correlated with values of optical density of the medium, measured by absorbance at 750 nm. A significant increase was observed in biomass production in cultures irradiated with red light (16.55 g/l) versus produced under blue light (12.95 g/l), white (14.96 g/l) and control (9.04 g/l). The higher cell density in the cultures supplemented with blue light ( $5.29 \cdot 10^{12}$  cells/ml), while larger cell weight was achieved in the control treatment. The results of this study show that the irradiation conditions in specific packages differentially enhance crop performance microalgae, acting on the parameters of cell growth and development, so that a combination of effects at suitable periods of cycle can ensure higher yields than those achieved in isolation.

**Keywords:** radiation, LEDs, growth, biomass.

## INTRODUCCIÓN

La investigación sobre microalgas ha crecido significativamente en las últimas décadas, debido a sus múltiples usos y aplicaciones (Mata et al., 2010). Las microalgas son microorganismos acuáticos, unicelulares y fotoautótrofos, con diámetros del orden de micrómetros (Zhang et al., 2014). Se caracterizan por ser capaces de utilizar recursos naturales de bajo coste ( $\text{CO}_2$  y sales inorgánicas), transformando la energía lumínica en diversos productos, aportando en muchos casos soluciones a problemas emergentes. Los problemas ambientales, la escasez de recursos, las fuentes de energía convencional o el calentamiento global son algunos de estos problemas (Xue et al., 2011). Las microalgas presentan la ventaja de producir grandes cantidades de metabolitos en períodos relativamente cortos de tiempo. Tienen altas tasas de crecimiento, de modo, que la producción y la calidad de biomasa pueden ser diferentes dependiendo de la cepa y de las condiciones de crecimiento, (Brennan and Owende, 2010). Esto ha supuesto un incremento en su utilización como fuentes de recursos agroalimentarios, biotecnológicos o bioenergéticos, como proteínas, lípidos y pigmentos (Rosenberg et al., 2008; Chisti, 2007). Su uso en el sector agrícola aún es limitado, aunque destacan como biofertilizantes, complementos fitoestimulantes o fitosanitarios de control biológico (Spolaore et al., 2006).

Aunque la aplicabilidad de las microalgas es amplia, siempre presenta limitaciones durante su cultivo. Estas limitaciones afectan al crecimiento, producción y calidad de la biomasa (Schoepp et al., 2014). Los sistemas y metodologías de cultivo son unas de las principales limitaciones. En la actualidad se utilizan sistemas cerrados y sistemas abiertos como sistemas de producción de microalgas. Ambos sistemas son más comúnmente conocidos como fotobiorreactores (Yen et al., 2014) o estanques aireados (Costa and de Morais, 2014). Durante el cultivo también se encuentran limitaciones debidas tanto a factores físicos, como químicos, dentro del propio sistema de cultivo, de tal manera, diferentes condiciones de crecimiento, pueden determinar diferentes tasas de crecimiento, así como diferentes composiciones celulares (Zhu et al., 2013). En cualquier sistema diseñado para producir altas tasas de crecimiento, se han de abordar cinco parámetros críticos estrechamente vinculados: luz, pH, temperatura, fertilización carbónica con dióxido de carbono y necesidades de nutrientes (Flynn et al., 2010; Markou et al., 2014; Xue et al., 2011).

El factor más limitante del crecimiento de las microalgas es la luz. (Ravelonandro et al., 2008; Richmond, 2004). Se puede limitar el crecimiento de microalgas en cualquier sistema, debido al efecto auto-shading (sombreado) entre células (Xue et al., 2011). Los cambios en la intensidad de la luz, clasificadas en varias fases, luz-limitación, luz-saturación y luz-inhibición (Ogbonna and Tanaka, 2000), o los cambios en los ciclos de luz/oscuridad. Cualquiera de estos tipos de efectos tienen una gran influencia en los resultados de crecimiento (Eustance et al., 2015; Jacob-Lopes et al., 2009). El tipo de fuente de luz también puede ser un factor crítico que afecte al crecimiento, ello es debido a la diferencia en la cobertura del rango de longitud de onda (Terry, 1986).

La iluminación LED es actualmente el sistema más eficiente de iluminación. El uso de LEDs suministra rangos de longitud de onda específicos para el crecimiento de microalgas, de entre los cuales destacan las longitudes de onda de luz azul y roja, capaces de ser captadas por clorofilas (Schulze et al., 2014). La luz roja y roja lejana es detectada por fotorreceptores como son los fitocromos obteniéndose las mayores eficiencias cuánticas en longitudes de onda de 660-680 nm en aquellas algas que contienen clorofilas a ( $\lambda \approx 680$  nm) y b ( $\lambda \approx 660$  nm) (Blanken et al., 2013), la eficiencia disminuye bruscamente cuando nos acercamos a longitudes de onda más largas. Curiosamente, el rojo a la luz roja lejana ( $\lambda \approx 630$ -750 nm) induce altas tasas de crecimiento y células más pequeñas por la aceleración del ciclo celular, sin embargo, la luz roja lejana puede suprimir la producción de biomasa volumétrica debido a una ruptura completa de la fotosíntesis (Lee and Palsson, 1996; Stadnichuk et al., 2011). La detección de bandas de longitud de onda más corta, como el azul ( $\lambda \approx 430$ -470 nm), es llevada a cabo por fotorreceptores como son los criptocromos y fototropinas. En algunas especies, este tipo de luz es responsable de la degradación endógena de las reservas de hidratos de carbono (Kamiya and Saitoh, 2002; Marchetti et al., 2012). Por otro lado pueden inducir la acumulación de pigmentos; El exceso de luz azul puede

producir un estrés fotooxidativo, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), de tal manera, que las microalgas acumulan pigmentos como acción fotoprotectora, como xantofilas (Fu et al., 2013; Jahns and Holzwarth, 2012).

El objetivo principal del trabajo es conocer los parámetros de crecimiento y desarrollo de la microalga *Scenedesmus sp* bajo diferentes parámetros de radiación lumínica, con el fin de conocer su respuesta. Esta respuesta puede permitir optimizar su producción para la obtención a gran escala de biomasa, rica en compuestos intracelulares, bioestimulantes, de aplicación en cultivos hortícolas de interés. Partiendo de este planteamiento, la hipótesis que planteamos es que, durante un cultivo de microalgas como es el caso de *Scenedesmus sp* la variación de las condiciones de irradiancia de longitud de onda en regiones específicas del espectro de emisión de la luz (regiones del rojo o regiones del azul), se conseguirán variaciones en el comportamiento metabólico celular ligadas a su crecimiento y desarrollo. En última instancia, esto supondría una variación en su propia composición intracelular, que puede afectar cuantitativamente a distintas fracciones de compuestos de interés para su aplicación como fitoestimulantes en plantas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha llevado a cabo en el laboratorio de Diagnóstico Nutricional del Departamento de Agronomía de la Universidad de Almería. Los inóculos de *Scenedesmus sp* fueron suministrados por la empresa Biorizon Biotech S.L (CIF B04706139). Se proporcionó en forma de inóculo en un tubo falcon con un volumen de 20 ml. Las condiciones de transporte fueron cuidadosas, preservando la menor alteración posible de las condiciones ambientales de transporte. Su traslado se realizó en una caja de poliespan, aislada de las condiciones del medio y refrigerada con una temperatura interna estable de 4°C.

### Pruebas preliminares

Los inóculos recibidos se sometieron a dos pruebas preliminares. Una primera de aclimatación y escalado que favoreciera el crecimiento celular de las mismas. Esta fase de aclimatación y escalado se llevó a cabo inoculando los 20 ml de microalga en un matraz erlenmeyer de 250 ml, al que se le adicionaron 80 ml de medio de cultivo BG11 (Tabla 1), en proporción 1/5.

La segunda prueba consistió en una comparación con un medio de cultivo diferente al empleado, denominado UTEX (Tabla 2). De igual forma se inocularon 20 ml de medio de cultivo procedentes del erlenmeyer de 250 ml (primera prueba), en dos frascos de 250 ml a los que se le incorporó, a cada uno de ellos, 80 ml de medios de cultivo, BG11 y UTEX. Las condiciones de cultivo para ambos casos fueron las mismas: Temperatura estable de 23°C y aireación con bomba de aire “Air Pump AP-9800©” de Jeneca®. Como iluminación complementaria se utilizó LEDs Blanco. El pH del medio se mantuvo en 7,5 y 8,3, para los medios BG11 y UTEX respectivamente. Las medidas de crecimiento de los cultivos se tomaron diariamente mediante densimetría óptica (D.O) a 750 nm, para tener constancia del progreso de los mismos.

### Diseño experimental

Se utilizaron 12 cajas de madera rectangulares de 20x30x15 cm revestidos en su interior de vinilo adhesivo blanco. Se proporcionó suficiente espacio abierto en la parte superior de cada caja para la ventilación (control de temperatura), la extracción de las muestras y la renovación de los medios. Cada caja constituye una unidad de cultivo (**Figura 1**). Cada tratamiento constaba de 3 unidades experimentales o repeticiones. En 9 de estas unidades experimentales se colocaron bandas de LEDs (marca Inspire®), compuestos de 30 LEDs m<sup>-1</sup> con una potencia de 7.2 W·m<sup>-1</sup>, alimentados por proveedores de energía de 12V. En estas unidades se seleccionaron tres longitudes de onda monobanda: blanca =T<sub>b</sub> (380-760 nm), roja=T<sub>r</sub> (620-645 nm) y azul = T<sub>a</sub> (460-475 nm), constituyendo grupos de 3 unidades para cada paquete de radiación.

El periodo de funcionamiento de los LEDs fue constante y coincidente con el hemoperiodo natural. Como tratamiento control ( $T_c$ ) se dispusieron 3 unidades experimentales sin iluminación complementaria.

### **Cultivo**

El medio de cultivo fue BG11 (Allen and Stanier 1968). Este es un medio de crecimiento general que permite el crecimiento de una gran variedad de microalgas. En la tabla 1 se describe su composición química (Allen 1968, Allen and Stanier 1968, Rippka et al 1979) citados por Andersen, (2005).

### **Condiciones de cultivo**

El cultivo se sometió a varias fases de escalado desde un volumen inicial de 20 ml contenidos en un tubo falcon hasta un volumen final de 3,6 L contenido en las 12 unidades experimentales (control y tratamientos). Fue necesario el escalado inicial y replicado de las muestras para poder configurar el experimento. La técnica de escalado fue progresiva siguiendo una proporción 1/5 (1 parte de muestra, 5 de medio). En primera instancia se utilizó un matraz Erlenmeyer de 100 ml, incorporando 20 ml de muestra y 80 ml de medio BG -11 (Tabla 1). Posteriormente se trasvasó a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y finalmente a un frasco de vidrio Schott Duran de 500 ml ocupando un volumen de cultivo de 300 ml.

La aireación y agitación de los cultivo fue constante, para facilitar la oxigenación y evitar la precipitación. Se llevó a cabo mediante una bomba de aire “Air Pump AP-9800® de “Jeneca” por cada unidad experimental. Se incorporaron filtros estériles de 0,3  $\mu\text{m}$  en los conductos de entrada de aire de entrada y salida de los cultivos.

### **Parámetros analizados**

Las muestras se tomaron diariamente (Figura 2). La densidad óptica (D.O) se obtuvo midiendo la absorbancia del medio a 750 nm (Flynn et al., 2010) en un espectrofotómetro UV-VIS “Helios; Thermo espectral”.

La cuantificación de la biomasa se efectuó por el método del peso húmedo/ peso seco, para cada repetición. Se utilizaron eppendorf de 1,5 ml de capacidad a los que se les adicionó 1 ml de medio y posteriormente se centrifugaron, en una centrífuga Hermle Z-320K, obteniendo el peso fresco y se sometieron a desecación en estufa de aire forzado a 70 °C durante 24 horas para obtener el peso seco. Para cuantificar los pesos se utilizó una balanza “Sartorius” con un error de  $\pm 0.002\text{g}$ . La densidad celular fue determinada en todos los tratamientos por recuento en microscopio usando un hematocitómetro Neubauer, (Figura 3). Se realizó la correspondiente medida de absorbancia y recuento de células diariamente para cada repetición en cada tratamiento. Los parámetros de densidad celular y biomasa se correlacionaron de manera general con la D.O a 750 con 2 ecuaciones lineales.

La tasa específica de crecimiento, MGR (g/día) se calculó mediante la fórmula:

$$\text{MGR} = (W_2 - W_1) * (t_2 - t_1)^{-1} \quad (1)$$

Donde  $(W_2 - W_1)$  se corresponde con la diferencia de biomasa entre la diferencia de tiempo  $(t_2 - t_1)$ , (Krug, 1997) citado por Wien, (1997).

La velocidad de crecimiento relativa, RGR (g/g\*día) se corresponde con la fórmula:

$\text{RGR} = (dW * dt^{-1}) * W^{-1}$ , donde  $(dW * dt^{-1})$  se corresponde con la derivada de la biomasa entre la derivada del tiempo, todo ello dividido entre la biomasa en ese momento, W.

Su valor fue calculado mediante la fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) * (t_2 - t_1)^{-1} \quad (2)$$

Donde  $(\ln W_2 - \ln W_1)$  representa a diferencia entre el logaritmo neperiano de la biomasa, dividido por la diferencia de tiempo,  $(t_2 - t_1)$ , (Krug, 1997) citado por Wien, (1997).

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphic ® Centuron XVII mediante análisis de varianza (ANOVA) con un  $\alpha = 0,05$ , para la determinación de tratamientos

significativamente diferentes. En los casos en que las variables mostraron diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis de secuencia de medias LSD con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Preliminares

El cultivo respondió de forma favorable tras su inoculación en el medio de cultivo BG-11 (tabla 1) para favorecer su estimulación y crecimiento, lo que permitió obtener suficiente inóculo del mismo para preparar el resto de tratamientos objeto de estudio. La prueba comparatoria entre los dos medios, BG11 y UTEX, (Figura 4). El medio de cultivo BG-11 aseguró una respuesta más rápida y fiable para el crecimiento de *Scenedesmus*. Por el contrario, el medio de cultivo UTEX, desarrolló un cultivo ineficiente, concluyendo en la muerte del mismo. Los mayores crecimientos iniciales medidos por absorbancia se correspondieron con los obtenidos en el medio BG-11, siendo el elegido para configurar el ensayo.

### Factores principales (Radiación y tiempo)

El análisis estadístico de los datos, (Tabla 3) muestra claramente diferencias significativas sobre el efecto de los factores radiación y tiempo de forma aislada e interactiva sobre las variables respuesta de interés de estudio: absorbancia, biomasa, densidad celular, biomasa celular, Tasa decrecimiento específica (MGR) y Velocidad de crecimiento específica (RGR), no habiendo efectos significativos del factor Repeticiones.

### Turbidez

Si analizamos los valores medios de absorbancia obtenidos tras las medidas diarias de los tratamientos, se aprecien diferencias significativas entre los tratamientos. De media, el tratamiento irradiado con LEDs rojo, se corresponde con el mayor valor de absorbancia obtenido 2,62 A, un 83.2% sobre el control, seguido del cultivo irradiado con LEDs blanco, con unos valores de 2,37 A, un 65.7% sobre el control, a continuación encontramos el tratamiento azul, cultivo irradiado con LEDs azul, con unos valores de 2,05 A, un 43.4 % sobre el control y finalmente el cultivo control, irradiado ambientalmente con un valor medio de absorbancia de 1,43. El comportamiento turbidométrico de los tratamientos monocromáticos respecto del suplementado con luz blanca es contrario. Así el tratamiento suplementario con luz azul,  $T_a$ , reduce su densidad óptica un 13.5%, mientras que  $T_r$ , incrementa un 10.5 % con respecto a  $T_b$ .

### Biomasa

Los tratamientos muestran efectos significativos sobre las variables de respuesta en los cultivos de la microalga *Scenedesmus*. En términos medios las menores producciones de acumulación de biomasa se han conseguido en  $T_c$  con una producción media de 9.046 g/l. Respecto del control, el tratamiento suplementario  $T_b$  incrementa un 65.3 % la producción de biomasa. Los tratamientos con luz monocromática  $T_a$  y  $T_r$  presentan incrementos de producción de biomasa respecto del control (sin luz complementaria) de 43.1 y 83% % respectivamente. El comportamiento productivo de los tratamientos monocromáticos respecto del suplementado con luz blanca es contrario. El tratamiento suplementario con luz azul  $T_a$  reduce el crecimiento un 13 %, mientras que  $T_r$  produce un incremento del 10.8% respecto de  $T_b$ .

El peso celular seco (g/L) de *Scenedesmus sp* se correlacionó con la DO a 750 nm con la ecuación lineal:

$$\text{Biomasa (g/L)} = 6,30583 * \text{Absorbancia (750nm)} \quad (r^2 = 0,9996) \quad (3)$$

### **Densidad celular media**

Si analizamos los valores medios de densidad celular, encontramos que tratamiento control presenta un número medio de células de  $1.1 \cdot 10^8$  células/ml (Tabla 3). La radiación suplementaria blanca incrementa hasta  $3.8 \cdot 10^8$  células/ml. La luz monocromática  $T_a$  y  $T_r$  incrementan hasta  $4.5 \cdot 10^8$  y  $5.3 \cdot 10^8$  células/ml respectivamente. El efecto de la luz monocromática respecto de la luz blanca supone en todos los casos un incremento en el número de células por unidad de volumen que es un 19.4% para  $T_r$  y un 37.9 para  $T_a$ . Los parámetros de densidad celular se correlacionaron de manera general con la DO a 750 nm con la ecuación lineal:

$$\text{N}^\circ\text{Células/ml} = -3,9805 \cdot 10^6 + 1,90176 \cdot 10^7 \cdot \text{Absorbancia (750nm)} \quad (r^2 = 0,8956) \quad (4)$$

### **Peso celular medio**

Estableciendo relación entre la biomasa y la densidad celular podemos calcular el peso celular medio. El peso celular medio de las células del tratamiento testigo es de  $8.3 \cdot 10^{-12}$  g/célula. Los tratamientos de luz complementaria disminuyen el peso medio de las células:  $T_a$  en un 69.8%;  $T_b$  en un 51.7% y  $T_r$  en un 45.3% respecto de  $T_c$ . La luz monocromática suplementaria supone una reducción del peso medio celular mayor que los complementos de luz blanca. Las células de  $T_r$  pesan un 5.5% menos y las de  $T_a$  pesan un 37.5% menos que las de  $T_b$  (Tabla 3).

### **Velocidad media de crecimiento**

Como parámetros de cinética de crecimiento, cabe destacar la velocidad media de crecimiento (MGR), (1), que se corresponde con la producción media diaria. El tratamiento control (sin radiación suplementaria) produce  $0,67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} / \text{día}$  (tabla 7). Respecto de esta producción media,  $T_a$  la incrementa en un 38.8%;  $T_b$  en un 58,2 y  $T_r$  en un 79.1%. El comportamiento de la radiación monocromática respecto de la blanca es, por tanto, diferente:  $T_r$  aumenta la producción media/día en un 13.2%, mientras que el  $T_a$  reduce la producción diaria en un 12.3% (Tabla 3).

### **Velocidad relativa de crecimiento**

Relacionado con la MGR encontramos la RGR, velocidad relativa de crecimiento que sucede durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos y expresa la velocidad máxima de crecimiento en ese momento (2). El tratamiento control presenta una RGR de  $0,132 \text{ g/g} \cdot \text{día}$  (Tabla 3). La radiación complementaria no presenta un comportamiento claro respecto de este parámetro. Los valores medios de  $T_b$  son un 9.2% mayores que los de  $T_c$ . La radiación monocromática produce incrementos de 11.5 y 16.6% para  $T_a$  y  $T_r$  respectivamente, respecto de  $T_c$ . Esto supone incrementos de 2.1 y 7.0 % para  $T_a$  y  $T_r$  respectivamente respecto de  $T_b$  (Tabla 3).

### **Interacciones radiación/tiempo**

El efecto interactivo de los factores tratamiento y tiempo (días) puede analizarse de manera gráfica dando indicación de sus efectos sobre las variables respuesta en los distintos cultivos objeto de estudio.

### **Producción de biomasa celular**

El crecimiento de la microalga presentó una tendencia similar (3) en todos los tratamientos evaluados (Figura 5). Se aprecia una fase de latencia, un periodo que alberga la primera semana de cultivo, donde los tratamientos produjeron cantidades similares de biomasa, no obstante, se aprecia una pequeña diferencia en el cultivo  $T_b$  que destaca sobre los demás cultivos. Durante todo el ciclo de cultivo,  $T_c$  presenta la menor producción de biomasa.

Conforme evolucionan los cultivos a lo largo del tiempo, se va apreciando una clara diferenciación en cuanto a la producción de biomasa. Hacia el día 10 de cultivo  $T_r$  supera el crecimiento de  $T_b$ . También se puede apreciar como  $T_a$  comienza a desarrollarse por encima de  $T_c$ . Nos encontramos en el periodo de crecimiento exponencial que duró entre los días 6 y 15, coincidiendo con la segunda y tercera semana de cultivo, donde se aprecia una clara diferencia entre los tratamientos

de tal modo que el cultivo irradiado con LEDs rojo el que más biomasa produce, seguido del cultivo irradiado con LEDs blanca y el cultivo irradiado con LEDs azul.

La gráfica nos muestra un periodo de adaptación de los cultivos rojo y azul durante la fase de latencia, primeros días de cultivo, siendo más productivos los cultivos blanco y control, posteriormente se induce la respuesta de ambos, presentando mayores producciones tanto en el caso del rojo con el blanco, como del azul con el control.

Los tratamientos siguen una evolución temporal correspondiente con las siguientes ecuaciones lineales:

$$\text{Control-Biomasa (g/L)} = 1,44955 + 0,607782 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9785) \quad (5)$$

$$\text{Blanco-Biomasa (g/L)} = 2,33439 + 1,01024 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9756) \quad (6)$$

$$\text{Azul-Biomasa (g/L)} = 0,259859 + 1,01538 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9754) \quad (7)$$

$$\text{Roja-Biomasa (g/L)} = 0,113935 + 1,31554 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9890) \quad (8)$$

### **Densidad Celular**

La densidad celular varió considerablemente (4). En la Figura 6 se representa la densidad celular, número de células / mililitro de cultivo en relación con el tiempo. Los resultados de la Figura 6 muestran una tendencia lineal en el incremento de células. Se aprecian diferencias claramente entre la densidad celular de los cultivos con radiación complementaria respecto del control. También se observa que durante un periodo, que alberga los 10 primeros días, no se aprecian diferencias estadísticas entre la densidad celular de los cultivos con iluminación artificial complementaria. A partir de la mitad de ciclo se aprecia claramente una diferencia entre estos cultivos, destacando el cultivo T<sub>a</sub>, seguido del cultivo T<sub>r</sub> y T<sub>b</sub>.

La evolución temporal de densidad celular para cada tratamiento se corresponde con las ecuaciones lineales:

$$\text{Control-N}^\circ\text{Cél/ml} = 821424 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9788) \quad (9)$$

$$\text{Blanco-N}^\circ\text{Cél/ml} = 2,885 * 10^6 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9759) \quad (10)$$

$$\text{Azul-N}^\circ\text{Cél/ml} = 4,164 * 10^6 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9757) \quad (11)$$

$$\text{Rojo-N}^\circ\text{Cél/ml} = 3,566 * 10^6 * t \text{ (días)} \quad (r^2=0,9891) \quad (12)$$

Donde N<sup>o</sup>Cél/ml, se corresponde con el número de células por mililitro y cada una de los valores que acompañan a “t” representan la velocidad de multiplicación celular diaria.

### **Efecto de la radiación sobre la velocidad relativa de crecimiento (RGR)**

La Figura representa la velocidad relativa de crecimiento (RGR) (2) en relación con el tiempo para cada uno de los tratamientos, control, azul, rojo y blanco. Los mayores valores de velocidad relativa de crecimiento se alcanzan para todos los tratamientos en los primeros días de cultivo, destaca entre los tratamiento. RGR Alcanza un valor máximo de 0.80 g/g\*día en T<sub>r</sub>, diferenciándose estadísticamente del resto de tratamientos, le sigue T<sub>b</sub>, con un valor de 0.70 g/g\*día y finalmente T<sub>c</sub> y T<sub>a</sub> con valores de en torno a 0.60 g/g\*día, no apreciándose diferencias entre ambos. Estadísticamente no se aprecian diferencias entre los tratamientos. Hacia final del periodo de cultivo todos los tratamientos presentan las mismas velocidades de crecimiento.

## **DISCUSIÓN**

La puesta en marcha de un cultivo de microalgas requiere de un conocimiento profundo de todos los parámetros que le afectan, tanto físicos como químicos además del propio comportamiento cinético de la microalga objeto de interés.

Los resultados obtenidos de las pruebas preliminares, nos aseguran, que no todos los medios de cultivo generales que podamos encontrar en la bibliografía, se adaptan a las condiciones propias de nuestros cultivos, tal ha sido nuestro caso, tras comparar dos medios, BG-11 y UTEX, la



microalga creció favorablemente el medio BG-11, obteniendo una respuesta rápida de crecimiento, mientras que en el medio UTEX se produjo la muerte del mismo.

Es de bien conocidos que el tipo de luz pueda ser un factor crítico que afecte al crecimiento de los cultivos, ello puede deberse principalmente a la diferencia de cobertura del rango de longitud de onda específica captada por los fotorreceptores y sus formas fotoconvertibles (Terry, 1986). El uso de LEDs, una fuente de iluminación eficiente, suministra rangos de longitud de onda específicos, como ha sido el caso en éste ensayo, de los cuales podemos destacar el azul, el blanco o el rojo capaces de ser captados por clorofilas y otros receptores como fitocromos o criptocromos (Schulze et al., 2014). Éste efecto de la fuente de luz sobre el metabolismo de las células de microalgas puede explicarse por el hecho de que la composición espectral de la luz emitida por los LEDs coincide correctamente con el área de absorción de clorofilas a y b presente en los complejos captadores de luz de algas verdes y las plantas superiores (Matthijs et al., 1996).

Los resultados de este estudio no se alejan mucho de los resultados obtenidos por otros ensayos realizados con otras especies de microalgas (Schulze et al., 2014; Vadiveloo et al., 2015; Wang et al., 2007; Xue et al., 2011) en los cuales se reflejan el efecto principal de la luz sobre el crecimiento de las microalgas. Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, destacan en todos ellos un efecto significativo para todos los cultivos irradiados de forma complementaria, con respecto al cultivo control, todos ellos presentan valores de MGR y RGR estadísticamente mayores con respecto al tratamiento control (obteniéndose los mayores valores para el tratamiento rojo) de tal modo que la luz influye de manera positiva sobre la estimulación de los cultivos. No obstante, no se aprecia un comportamiento claro entre los tratamientos irradiados con LEDs (Tabla 3).

La luz altera el metabolismo celular, induciendo altas tasas de crecimiento y células de menor tamaño, debido principalmente a la aceleración de los ciclos celulares, tal y como ha sido descrito por otros autores resultados (Chen et al., 2010; Lee and Palsson, 1996). La rápida proliferación celular y las altas tasas de crecimiento inducidas por  $T_r$ , a diferencia del resto de tratamientos, siguiendo un patrón lineal (8) con el que se obtienen las mayores producciones de biomasa (Figura 5). La luz emitida por los tratamientos  $T_b$  y  $T_a$ , inducen tasas de crecimiento pero en menor medida (6); (7). No obstante, los resultados muestran una respuesta directa del efecto de la luz sobre el crecimiento de los cultivos y la producción de biomasa, las fuentes de iluminación complementaria estimulan mayores producciones, en todos los casos, con respecto a un cultivo irradiado ambientalmente (3).

La relación ente la producción de biomasa y la densidad celular, parece presentar un efecto contradictorio entre  $T_r$  y  $T_a$ . La mayor producción de biomasa, no está relacionada con los mayores valores de densidad celular. Esto puede deberse a que la luz, en función de la longitud de onda específica, puede estar actuando de manera selectiva sobre el desarrollo y comportamiento de los cultivos, de tal manera que la iluminación LEDs en rojo estimula el crecimiento y en medida la proliferación celular mucho más que la iluminación LEDs en blanco o con iluminación ambiental, sin embargo se aprecia un efecto claro de la iluminación LEDs azul sobre la proliferación celular, de tal modo que la luz azul estimula el crecimiento de los cultivo en menor medida que con irradiancia blanca o roja, (Figura 5) pero ejerce un efecto directo sobre los ciclos de división celular (Figura 6). Éste efecto puede deberse a la propia acción de la luz, en algunos cultivos se tiene constancia que en exceso de luz roja puede actuar suprimiendo la producción de biomasa volumétrica cuando se completa con una fuente de luz de banda ancha, debido a que la propia luz regula los mecanismos captadores, los complejos captadores, en microalgas (Lee and Palsson, 1996; Stadnichuk et al., 2011). Aunque durante el ensayo los cultivos han estado sometidos a iluminación interrumpida coincidente con los ciclos naturales, la aplicación de complementos de luz roja y azul ha podido influir en los correctos ritmos circadianos del desarrollo celular.

Las mayores proliferaciones celulares se han dado en los cultivos  $T_a$  irradiados con LEDs azul (Figura 6). En estudios con microalgas cianobacterias, las mayores eficiencias fotosintéticas se consiguen con la luz azul, éstos microorganismos presenta complejos fotorreceptores como son los

criptocromos, más especializados que los desarrollados en algas verdes y plantas superiores, de tal manera que el efecto, a baja intensidad de irradiancia, de luz azul se consiguen altas producciones y un crecimiento óptimo (Kebede and Ahlgren, 1996).

No siempre se cumple esta regla ya que en la mayoría de los casos se aprecian efectos negativos sobre los cultivos debido al exceso de luz azul, muy energética, induciendo procesos de fotoinhibición y en otros casos generando especies reactivas del oxígeno (ROS) (Fu et al., 2013). También parece actuar sobre los ciclos de división celular induciendo fases de división celular prematuras, no dando tiempo a un crecimiento completo de las células y con ello se genera una mayor proliferación celular, con células de pequeño tamaño (Oldenhof et al., 2004) tal y como ocurre en nuestros resultados.

Si tenemos en cuenta esta relación inversa entre estimulación del crecimiento y estimulación de la división celular que se da entre los cultivos irradiados con luz roja y azul, podemos observar que el peso celular es un factor clave en el desarrollo de los cultivos corroborando los resultados obtenidos (Tabla 3). El tratamiento que menor peso celular presenta se corresponde con el cultivo irradiado con LEDs azul, y no obstante no sea el que mayor biomasa produce, de tal manera que el cultivo irradiado con LEDs azul se comporta como el cultivo con mayor proliferación celular y con ello menor tamaño celular.

El tratamiento rojo, cultivo irradiado con LEDs rojo, es el segundo con menor peso celular, pero se corresponde con el que mayor crecimiento presenta. El tratamiento blanco, cultivo irradiado con LEDs blanco, tiene un comportamiento medio entre los tratamientos azul y rojo, presenta tasas de crecimiento intermedias entre ambos tratamientos, con densidades celulares inferiores también a ambos y con pesos celulares invariables a lo largo del periodo de cultivo, lo que nos dice, que el tamaño celular ha variado poco durante el cultivo. Si destaca el cultivo control, irradiado ambientalmente y aunque presenta claramente diferencias con respecto al resto de tratamientos en cuanto a la producción de biomasa y el número de células, si destaca claramente y se diferencia en el peso celular. Los resultados muestran que se corresponde con el cultivo con mayor peso celular, lo que se traduce en células más grandes, de mayor tamaño.

Los resultados obtenidos muestran una clara evidencia del efecto de la luz sobre la estimulación de los cultivos, es posible inducirles mayores producciones alterando el comportamiento de los mismos de tal manera se puede optimizar la producción de microalgas conociendo los efectos más destacables de cada uno de ellos y en tal medida aplicarlos en el momento más adecuado. Los resultados muestran mayores tasas de crecimiento en cultivos irradiados con LEDs rojo, mientras otros cultivos destacan por inducir procesos de división celular, como es el caso de los cultivos irradiados con LEDs azul, de tal manera que resultaría interesante establecer una relación entre ambos. Estudios con la microalga *Scenedesmus* han demostrado mayores tasas de producción de biomasa cuando se alterna la luz roja con la luz azul (Carroll et al., 1970; Ho et al., 2014).

La luz roja se comporta como estimulante del crecimiento celular, en este sentido sería favorable inducir un cultivo con irradiancia LEDs azul hasta la fase máxima de crecimiento, favoreciendo la proliferación celular y en tal momento complementarle con irradiancia roja, induciendo con ello una estimulación del crecimiento. Esto sugiere que las proporciones de rojo y azul pueden ser adecuados para las algas verdes, debido a que sus plastos están estrechamente relacionados con los de las plantas terrestres en términos de estructura, metabolismo y composición bioquímica. Esta hipótesis parece ser correcta, ya que la mezcla de fotones rojos y azules en esta proporción han aumentado a menudo la producción de biomasa de un 10 a un 30% en comparación con la luz roja solo (Ho et al., 2014; Nhut and Nam, 2010).

Este efecto alternante resulta interesante siempre y cuando nuestro objetivo consista en producir biomasa. Hay que tener en cuenta que detrás de este efecto de la luz sobre la cinética de crecimiento de los cultivos también destaca en importancia la producción de metabolitos de interés, como puedan ser lípidos, proteínas, pigmentos o incluso la optimización en el consumo de nutrientes.

## CONCLUSIONES

Si evidenciamos los resultados obtenidos de este estudio podemos concluir que una buena técnica de producción de biomasa, con finalidad para obtener bioestimulantes, pueda consistir en intentar interaccionar de forma secuenciada el efecto conjunto de irradiancia azul, (que favorezca la proliferación celular) y roja (que favorezca el crecimiento celular) a lo largo del periodo de cultivo, habiéndose sometido previamente a una fase de adaptación y aclimatación bajo luz blanca. Con ello nos aseguramos una respuesta adaptativa rápida y eficiente del cultivo con mayores producciones acumulativas de biomasa cosechable en menores tiempos de cultivo, optimizando con ello la producción.

## AGRADECIMENTOS

A mi familia y los integrantes del grupo de investigación RNM: 151, como al cuerpo docente del HMI, destacando la labor de Miguel Guzmán como tutor del proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, R.A., (Ed). 2005. Algal Culturing Techniques. Academic Press.
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res.* 2, 333–340. doi:10.1016/j.algal.2013.09.004
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Carroll, J.W., Thomas, J., Dunaway, C., O’Kelley, J.C., 1970. Light induced synchronization of algal species that divide preferentially in darkness. *Photochem. Photobiol.* 12, 91–98. doi:10.1111/j.1751-1097.1970.tb06043.x
- Chen, H.-B., Wu, J.-Y., Wang, C.-F., Fu, C.-C., Shieh, C.-J., Chen, C.-I., Wang, C.-Y., Liu, Y.-C., 2010. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochem. Eng. J.* 53, 52–56. doi:10.1016/j.bej.2010.09.004
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Costa, J.A.V., de Morais, M.G., 2014. An open pond system for microalgal cultivation in: *Biofuels from Algae* pp. 1-22. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-59558-4.00001-
- Eustance, E., Wray, J.T., Badvipour, S., Sommerfeld, M.R., 2015. The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in *Scenedesmus dimorphous*. *Algal Res.* 10, 33–40. doi:10.1016/j.algal.2015.04.002
- Flynn, K.J., Greenwell, H.C., Lovitt, R.W., Shields, R.J., 2010. Selection for fitness at the individual or population levels: modelling effects of genetic modifications in microalgae on productivity and environmental safety. *J. Theor. Biol.* 263, 269–80. doi:10.1016/j.jtbi.2009.12.021
- Fu, W., Guðmundsson, O., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésson, O.S., Pálsson, B.O., Brynjólfsson, S., 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2395–403. doi:10.1007/s00253-012-4502-5
- Ho, S.-H., Chan, M.-C., Liu, C.-C., Chen, C.-Y., Lee, W.-L., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2014. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresour. Technol.* 152, 275–82. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.031
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C.H.G., Lacerda, L.M.C.F., Franco, T.T., 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48, 306–310. doi:10.1016/j.cep.2008.04.007
- Jahns, P., Holzwarth, A.R., 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 182–93. doi:10.1016/j.bbabi.2011.04.012
- Kamiya, A., Saitoh, T., 2002. Blue-light-control of the uptake of amino acids and of ammonia in *Chlorella* mutants. *Physiol. Plant.* 116, 248–254. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1160215.x
- Kebede, E., Ahlgren, G., 1996. Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia* 332, 99–109.
- Krug, H., 1997. Environmental influences on development, growth and yield in *The physiology of vegetable crops*. pp.101-180. H.C.Wien,Cab International.
- Lee, C.G., Pálsson, B., 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol. Prog.* 12, 249–256.

- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R., Cadoret, J.P., 2012. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J. Appl. Phycol.* 25, 109–119. doi:10.1007/s10811-012-9844-y
- Markou, G., Georgakakis, D., 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energy* 88, 3389–3401. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.042
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K., 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res.* 65, 186–202.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Matthijs, H.C., Balke, H., van Hes, U.M., Kroon, B.M., Mur, L.R., Binot, R.A., 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnol. Bioeng.* 50, 98–107. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<98::AID-BIT11>3.0.CO;2-3
- Nhut, D.T., Nam, N.B., 2010. Light-Emitting Diodes (LEDs): An artificial lighting source for biological studies, in: *IFMBE Proceedings*. pp. 134–139. doi:10.1007/978-3-642-12020-6-33
- Ogbonna, J.C., Tanaka, H., 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation - Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors, in: *Journal of Applied Phycology*. pp. 207–218.
- Oldenhof, H., Zachleder, V., van den Ende, H., 2004. Blue light delays commitment to cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biol. (Stuttg.)* 6, 689–95. doi:10.1055/s-2004-821341
- Ravelonandro, P.H., Ratianarivo, D.H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., Rahehimandimby, M., 2008. Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 842–848. doi:10.1002/jctb.1878
- Richmond, A., 2004. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512, 33–37. doi:10.1023/B:HYDR.0000020365.06145.36
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 430–6.
- Schoepp, N.G., Stewart, R.L., Sun, V., Quigley, A.J., Mendola, D., Mayfield, S.P., Burkart, M.D., 2014. System and method for research-scale outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 166, 273–81. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.046
- Schulze, P.S.C., Barreira, L.A., Pereira, H.G.C., Perales, J.A., Varela, J.C.S., 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* 32, 422–30. doi:10.1016/j.tibtech.2014.06.001
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. doi:10.1263/jbb.101.87
- Stadnichuk, I.N., Bulychev, A.A., Lukashev, E.P., Sinetova, M.P., Khristin, M.S., Johnson, M.P., Ruban, A. V., 2011. Far-red light-regulated efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in the red microalga *Galdieria sulphuraria* and photosystems-related heterogeneity of phycobilisome population. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 227–35. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.018
- Terry, K.L., 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 988–995.
- Vadiveloo, A., Moheimani, N.R., Cosgrove, J.J., Bahri, P.A., Parlevliet, D., 2015. Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Algal Res.* 8, 121–127. doi:10.1016/j.algal.2015.02.001
- Wang, C.-Y., Fu, C.-C., Liu, Y.-C., 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* 37, 21–25. doi:10.1016/j.bej.2007.03.004
- Wien, H.C., (Ed) 1997. *The physiology of vegetable crops*. Cab International.
- Xue, S., Su, Z., Cong, W., 2011. Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *J. Biotechnol.* 151, 271–7. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.12.012
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2014. *Biofuels from Algae*, *Biofuels from Algae*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-59558-4.00002-4
- Zhang, Y., Kendall, A., Yuan, J., 2014. A comparison of on-site nutrient and energy recycling technologies in algal oil production. *Resour. Conserv. Recycl.* 88, 13–20.
- Zhu, J., Rong, J., Zong, B., 2013. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese J. Catal.* 34, 80–100. doi:10.1016/S1872-2067(11)60497-X

## TABLAS

Tabla 1.- Composición Medio BG-11

Componentes	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Adicción Medio de Cultivo		Concentración Final (M)
		(g/L)	(ml/L)	
Ácido Cítrico	6,00	---	1,00	3,12 x 10 <sup>-5</sup>
Amonio citrato Férrico	6,00	---	1,00	≈ 3,00 x 10 <sup>-5</sup>
NaNO <sub>3</sub>	---	1,50	---	1,76 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	40,00	---	1,00	1,75 x 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75,00	---	1,00	3,04 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36,00	---	1,00	2,45 x 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20,00	---	1,00	1,89 x 10 <sup>-4</sup>
MgNa <sub>2</sub> EDTA·H <sub>2</sub> O	1,00	---	1,00	2,79 x 10 <sup>-6</sup>
Solución Metales Traza	Tabla	---	1,00	---

Componentes	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Adicción		Concentración Final (M)
		(g/L)	(ml/L)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	---	2,860	---	4,63 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	---	1,810	---	9,15 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	---	0,220	---	7,65 x 10 <sup>-7</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	79,00	---	1,00	3,16 x 10 <sup>-7</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	---	0,391	---	1,61 x 10 <sup>-6</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	49,40	---	1,00	1,70 x 10 <sup>-7</sup>

Tabla 2.- Composición Medio UTEX

Componentes	Adicción Medio de Cultivo		Concentración Final (mM)
	(g/L)	(ml/L)	
NaHCO <sub>3</sub>	13,61	---	162,00
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03	---	38,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	---	2,90
NaNO <sub>3</sub>	2,50	---	29,40
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	---	5,74
NaCl	1,00	---	17,10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20	---	0,81
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,04	---	0,27
Solución de Metales	---	6,00	---

Componentes	Adicción (g/L)	Concentración Final (mM)
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0,750	2,0000
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,097	0,3600
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,041	0,2100
ZnCl <sub>2</sub>	0,005	0,0370
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002	0,0084
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,004	0,0170

Componentes	Adicción (g/L)	Concentración Final (μM)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,020	0,080
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,044	0,150
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,020	0,084
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,012	0,061
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,012	0,052
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,620	10,000
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0,050	0,130

Componentes	Cantidad g/200 ml
HEPES Buffer pH 7.8	2,400
Vitamina B <sub>12</sub>	0,027

**Tabla 3.- Análisis Estadístico**

	<b>Absorbancia (750 nm)</b>	<b>Biomasa (g/l)</b>	<b>Densidad Celular (N°Cél/ml*10<sup>8</sup>)</b>	<b>Peso Celular (g*10<sup>-12</sup>)</b>	<b>MGR (g/día)</b>	<b>RGR (g/g*día)</b>
<b>Tratamiento</b>	<0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
T <sub>c</sub>	1,43a	9,05a	1,08a	8,21d	0,67a	0,13abc
T <sub>b</sub>	2,37c	14,96c	3,77b	3,97c	1,06cbd	0,142bacd
T <sub>a</sub>	2,05b	12,95b	5,24d	2,48a	0,93bc	0,145cabd
T <sub>r</sub>	2,62d	16,56d	4,46c	3,75b	1,20dc	0,152dbc
<b>Tiempo</b>	<0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
<b>Radiación*Tiempo</b>	<0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
<b>Repeticiones</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Letras: a, b, c, d muestran las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

< 0.05, efecto significativo, nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ).

Ns, no significativo.

## FIGURAS



Figura 1.- Diferentes unidades experimentales. De izquierda a derecha: Tratamiento control, blanco, azul y rojo

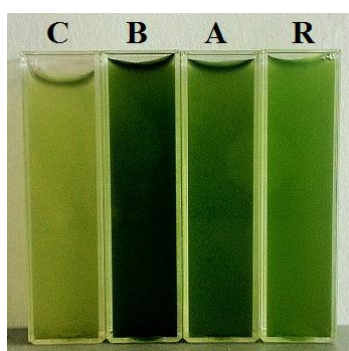


Figura 2.- Muestras tomadas de los distintos tratamientos: Control (C); Blanco (B); Azul (A) y Rojo (R). Densidad óptica medida por absorbancia a 750 nm.

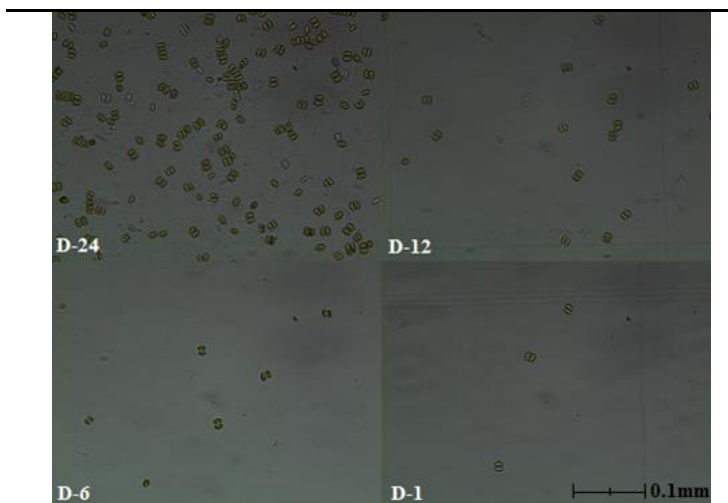


Figura 3.- Densidad celular media de los cultivos en los días: 1; (D-1), 6; (D-6), 12; (D-12) y 24; (D24). Recuento del número celular en cámara de Neubauer.



Figura 4.- Diferencia entre los medios BG-11 (izquierda) y UTEX (derecha) tras tres días de cultivo.

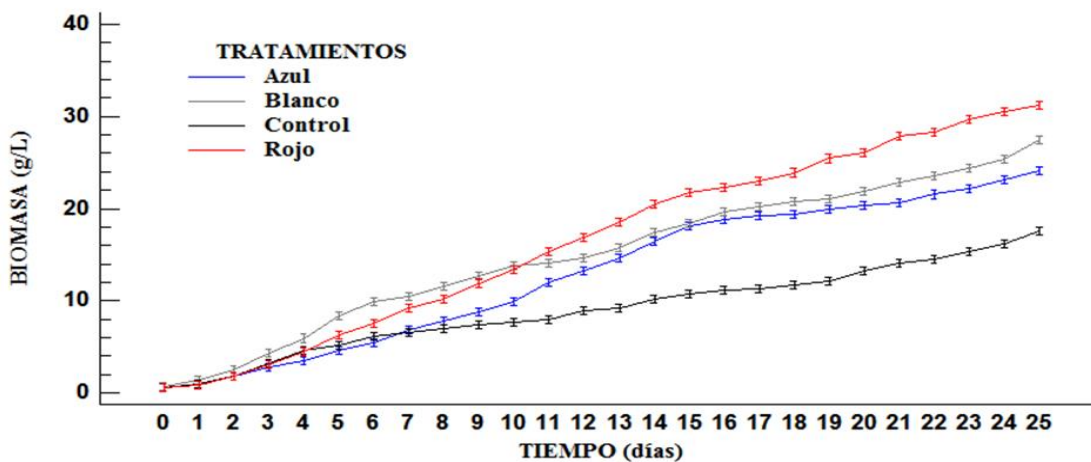


Figura 5.- Se representa la evolución temporal de la producción de biomasa para cada uno de los tratamientos.



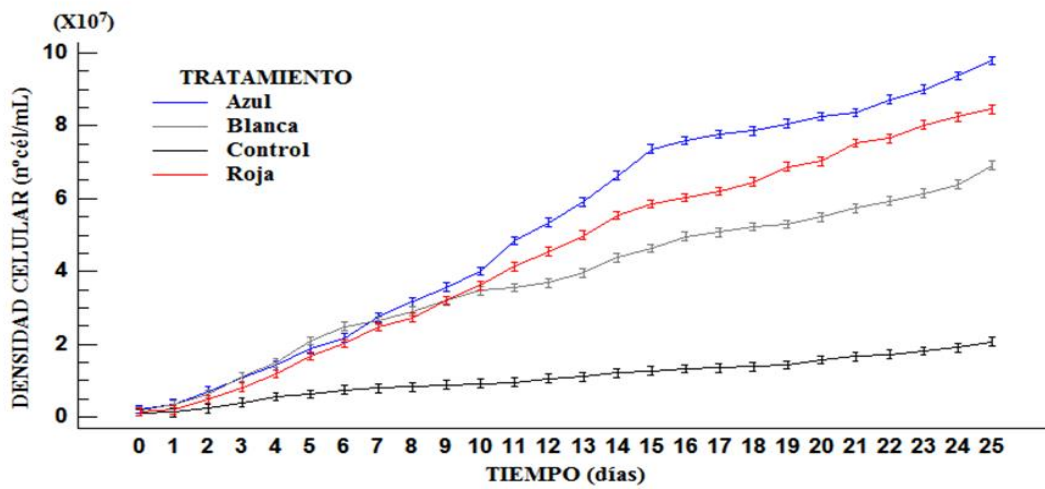


Figura 6.- Se representa la evolución temporal de la densidad celular (n° células/ml) para cada uno de los tratamientos.

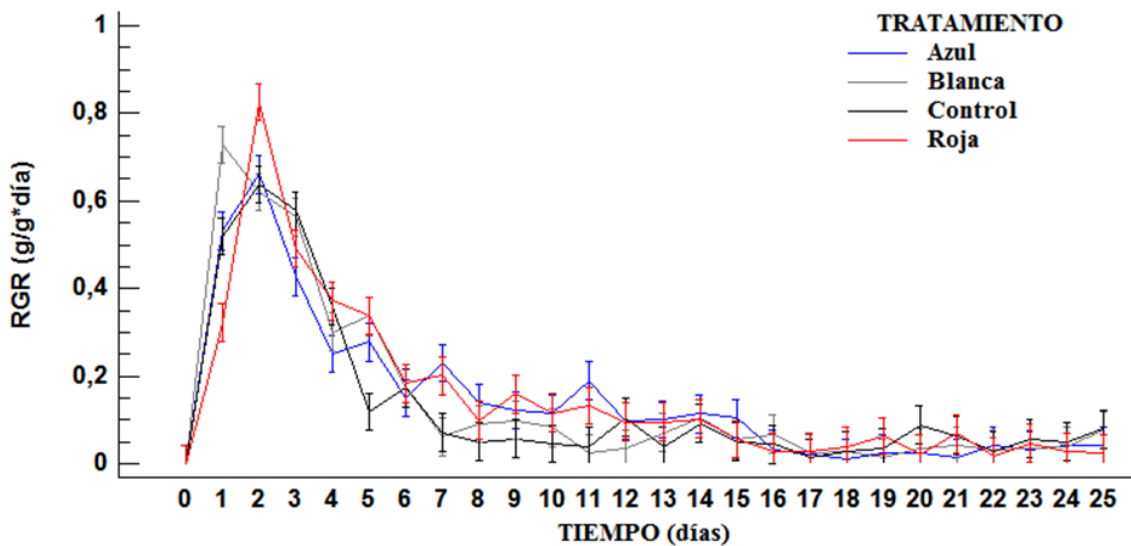


Figura 7.-Se representa la evolución temporal de la Velocidad relativa de crecimiento, RGR (g/g\*día), para cada uno de los tratamientos.