

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

“Puesta a punto de un fotobiorreactor tipo *Raceway* con iluminación LED para cultivo de dinoflagelados”

Curso 2016/2017

Alumno/a:

Nina Nilius

Director/es:

Francisco García Camacho
Lorenzo López Rosales



**PUESTA A PUNTO DE UN FOTOBIORREACTOR TIPO
RACEWAY CON ILUMINACIÓN LED PARA CULTIVO
DE DINOFLAGELADOS**



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química Industrial

Universidad de Almería

Realizado por

Nina Nilius

Dirigido por

Francisco García Camacho

Lorenzo López Rosales





*“El mayor misterio del mundo
es que resulta comprensible”*

Albert Einstein



Índice general

1.	Interés y objetivos	7
1.1.	Resumen	7
1.2.	Introducción	7
1.2.1.	Diseño de <i>FBR</i> s	8
1.2.2.	Aplicaciones y producción de sustancias bioactivas	10
1.3.	Objetivos	11
1.4.	Plan experimental	12
	Fase A: Caracterización del <i>FBR Raceway</i>	12
	Fase B: Montaje panel LED y controladores del <i>FBR</i>	13
	Fase C: Cultivo de <i>A. carterae</i>	13
2.	Revisión Bibliográfica.....	15
2.1.	Iluminación	15
2.2.	Temperatura	20
2.3.	pH.....	22
2.4.	Agitación.....	22
2.5.	Estrés hidrodinámico en cultivos	23
3.	Materiales y métodos	25
3.1.	Microalga	25
3.2.	Sistema de cultivo	25
3.3.	Caracterización fluidodinámica del <i>FBR</i>	26
3.4.	Métodos cuantitativos para medir el crecimiento.....	29
3.4.1.	Citometría de flujo	29
3.5.	Medida de nutrientes	29
3.5.1.	Determinación Nitratos	30
3.5.2.	Determinación Fosfatos.....	30
3.6.	Medida de actividad hemolítica	31



3.7.	Cinética de Crecimiento	32
3.8.	Eficiencia Fotosintética	32
3.9.	Campo de irradiancias dentro del FBR	33
4.	Fases de la realización del trabajo y su cronograma asociado	35
	Fase 1: Caracterización del FBR <i>Raceway</i>	35
	Fase 2: Montaje panel LED y controladores del <i>FBR</i>	37
	Fase 3: Cultivo de <i>A. carterae</i>	37
5.	Resultados y discusión	41
	5.1. Evaluación fluidodinámica.....	41
	5.2. Cultivo de <i>Amphidinium carterae</i>	44
6.	Conclusiones	47
7.	Bibliografía	48



1. Interés y objetivos

1.1. Resumen

Se consiguió satisfactoriamente la puesta a punto de un fotobiorreactor (*FBR*) tipo Raceway (*FBR-RW*) de 30L iluminado artificialmente con tiras de diodos de emisión de luz (*LED*) para el cultivo discontinuo del dinoflagelado *Amphidinium carterae*. El perfil de irradiancia aportado por este tipo de diodos imita la luz solar natural. El *FBR* se encontraba provisto de dispositivos que aseguraban el registro y el control del pH a un valor de 8.5 por medio de inyecciones de CO₂ para evitar así limitación de carbono. La mezcla en el interior del *FBR* fue suministrada por medio de una pala de policloruro de vinilo (*PVC*) que poseía una velocidad angular de 26 rpm. El cultivo se mantuvo siempre a una temperatura de 21± 1 °C por medio de un intercambiador de calor constituido por tubos de acero inoxidable. Las condiciones de operación fijadas permitieron alcanzar una concentración final de células próxima a 1.6x10⁶ células·mL⁻¹.

1.2. Introducción

Los dinoflagelados constituyen un grupo de microalgas de las cual la mitad son fotosintéticas mientras que el resto de las especies basan su nutrición en alguna forma heterótrofa de alimentación [1], [2]. Las microalgas constituyen una fuente de producción barata de gran variedad de sustancias de alto valor añadido que son los precursores de biocombustibles, fármacos, proteínas recombinantes, aditivos alimentarios, aminoácidos esenciales, etc.

A partir de los años 80, se establecieron instalaciones de producción de microalgas en Asia India, EE.UU., Israel y Australia. La mayoría de estas instalaciones usaban *Arthrospira* (= *Spirulina*, una cianobacteria) y *Chlorella*, para la obtención de alimentos o para extraer aditivos alimentarios [3]. Los sistemas externos de producción de microalgas han evolucionado considerablemente durante la pasada década, desde los *FBRes* abiertos más tradicionales, como tanques de tipo Raceway [4], hasta los *FBRes* cerrados más modernos y complejos (tubulares o superficie plana “flat plate”) [5], [6].

La importancia biotecnológica de las microalgas marinas dinoflageladas como productoras de una gran variedad de sustancias bioactivas ha sido ampliamente reconocida en los últimos años. Los principales sectores interesados en las biomoléculas producidas por esta división microalgas son los relacionados con la Industria



Farmacéutica (macrólidos, poliéteres o policétidos son bioactivos de interés), y la Industria Alimentaria del sector pesquero (la demanda de patrones certificados de biotoxinas no ha parado de crecer en las últimas décadas). Sin embargo, la disponibilidad de estos metabolitos es extraordinariamente escasa. Solo unas pocas toxinas son accesibles comercialmente y con precios ciertamente elevados. Debido a su complejidad estructural de estas biomoléculas, su producción por síntesis química es prácticamente inviable en la mayoría de los casos. Otras posibles vías de producción como la expresión de enzimas clave implicadas en las rutas de biosíntesis (e.g. policétidosintetasa), o la clonación de genes de dinoflagelados, en otros microorganismos fáciles de cultivar están lejos de ser implementadas debido a la complejidad del genoma de estas microalgas. En consecuencia, la solución más factible a medio plazo pasa por producir biomasa de dinoflagelados en *FBRs*.

Hasta la fecha el mayor número de publicaciones existentes referentes a dinoflagelados no usan una visión ingenieril ya que no tienen en cuenta aspectos importantes en su cultivo como puede ser su elevada fragilidad ante el estrés hidrodinámico, las necesidades lumínicas o nutricionales de éstos [7], [8].

Debido a todo lo expuesto con anterioridad se pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios que permitan entender el comportamiento de los dinoflagelados en diversos tipos de *FBRs*, optimizar las condiciones de operación éstos y aportar metodologías que permitan afrontar con garantías el cultivo masivo de dinoflagelados [9].

1.2.1. Diseño de *FBRes*

Mezcla

La recirculación de la suspensión es un elemento de gran importancia ya que afecta a la productividad del cultivo. El dispositivo de impulsión más común es la rueda de paletas o "*paddle wheel*" y consigue mantener el cultivo en suspensión y mezclado con un gasto de potencia bajo. Sin embargo una agitación excesiva provoca un estrés hidrodinámico al que pueden verse sometidas las microalgas y ocasiona daños irreversibles en las células [10].

Uno de los factores más determinantes en la actividad fotosintética es la cantidad de energía disponible por célula incluso más que la cantidad de energía luminosa incidente



[11]. En sistemas de cultivo no agitados o donde la mezcla es muy pobre se produce un efecto de autosombreado entre células que provoca gradientes de iluminación dentro del seno del *FBR*. Es necesario implementar sistemas de mezclado en los *FBR* que aseguren que todas las células estén en constante movimiento, exponiéndolas con una frecuencia razonable a zonas de mayor iluminación y homogeneizando de esta manera la distribución de luz en el medio.

Iluminación

La intensidad de luz puede afectarse por factores como: Distancia entre la fuente de energía lumínica y el *FBR*, geometría del *FBR*, longitud de onda de la fuente luminosa, aumento de concentración celular, formación de biopelículas en las paredes y formación de productos, provocando debido a efecto de sombreado la formación de dos zonas (oscura e iluminada). En la zona iluminada, las células son expuestas a la luz necesaria para producir fotosíntesis; en la zona oscura las células reciben poca o casi nada de luz para su metabolismo. Los dinoflagelados fotosintéticos pueden ver alterado su ritmo de crecimiento y la producción de bioactivos en respuesta a variaciones en el régimen de luz (irradiancia/composición del espectro y calidad de la luz/ fotoperiodo) [12]. La fuente de iluminación, solar o artificial, influye sobre la distribución y la cantidad de energía recibida por la célula afectando a su crecimiento y composición bioquímica.

El parámetro que puede considerarse como básicos para describir la disponibilidad de energía bajo una iluminación intermitente es la relación de los periodos luz/oscuridad (L/O). Estos, junto con la intensidad de la luz y la trayectoria de la luz en el *FBR*, establecen en gran medida el régimen de iluminación, el cual es un indicador de la disponibilidad de luz para una célula individual. Para asegurar la máxima actividad fotosintética y la mejor utilización de la luz incidente, se requiere de un régimen de iluminación óptimo suministrado a través del régimen de mezcla del cultivo.

Geometría

El *FBR* tipo *Raceway* es uno de los *FBRs* más convencionales; consiste en un estanque de recirculación de poca profundidad donde la agitación se da mecánicamente mediante un dispositivo de impulsión de paletas. Las palas se diseñan con bordes redondeados para disminuir el efecto de estrés hidrodinámico y evitar el daño de las células además de evitar en mayor medida posible la acumulación de biomasa. El canal



semicircular evita el efecto de producción de olas que rompan contra las paredes del *FBR* y puedan dañar la célula. Al fondo del *FBR* y cercano a la paleta se introduce la fuente de carbono, aire enriquecido con CO₂.

En cultivos de microorganismos fotoautótrofos en los que otros factores no son limitantes, la disponibilidad de luz determina la intensidad a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determina también la velocidad de crecimiento.

1.2.2. Aplicaciones y producción de sustancias bioactivas

Para asegurar la calidad alimentaria de productos extraídos del mar respecto a su contenido en biotoxinas y que, por lo tanto, desde el punto de vista toxicológico son aptos para el consumo humano son necesarios patrones de certificación. La validación y calibración de los ensayos toxicológicos requieren estándares de referencia de biotoxinas. Aunque se ha producido un aumento en el número de patrones disponible, la variedad de estos es todavía escasa. La Tabla 1 muestra una serie de biotoxinas de dinoflagelados comercializadas actualmente. El precio de éstas varía en gran medida dependiendo de su disponibilidad, del origen y de su pureza.

Tabla 1. Precio (€ mg⁻¹ en 2011) de toxinas de dinoflagelados

Biotoxina	Fuente	
	SGA	GEN ^b
Ácido okadáico, sal de sodio	6760	5110
Ácido okadáico, sal de potasio	5560	-
Ácido okadáico, (HPLC film)	6280	-
Ácido okadáico	901	3010
Ácido okadáico, sal de amonio	9460	5110
Ácido okadáico, (síntesis química) ^c	340	-
Okadol	7400	10380
Saxitoxina diacetate	13450	-
Neo-saxitoxina	30980	-
Brevetoxina	10500	8754
Brevetoxina	-	8526
Brevetoxina	13800	9464
Tetrodotoxina	-	276

SGA: Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com); GEN: Gentauro Molecular Products (www.gentaur.com).

^bTetrodotoxina de cultivos bacteriales

^cProducto descontinuado

Las sustancias bioactivas producidas por dinoflagelados presentan una elevada bioactividad por lo que han despertado interés en sectores farmacológicos [13]. La



producción de 150 g de un bioactivo de dinoflagelado requiere un volumen e cultivo de 10^3 a 10^5 m³ [14]. Este volumen es mucho más grande si lo comparamos con el volumen de cultivo que se necesita para producir la misma cantidad de la penicilina G. Una opción para reducir el volumen necesario de cultivo y los costes de producción es obtener una elevada concentración del bioactivo. Para lograr el objetivo anterior se pueden seleccionar cepas superproductoras y/o mediante modificación genética, como ha sido demostrado previamente para muchos antibióticos comerciales derivados de hongos y bacterias.

Los cultivos de microalgas convencionales en *FBRs* es un hito ampliamente logrado [15], [16], pero en el caso de los dinoflagelados es una tarea pendiente. Las concentraciones de biomasa que suelen alcanzar los cultivos fotosintético de dinoflagelados suelen ser bajas [17], [18], muy por debajo de 1 g L^{-1} , este hecho junto con la baja productividad de toxinas por células, del orden de picogramos, ponen de manifiesto el gran margen de mejora que presenta la biotecnología de dinoflagelados para poder asegurar un suministro estable de estándares de calidad.

1.3. Objetivos

El objetivo principal perseguido con la ejecución de este *TFG* es la puesta a punto de un *FBR* tipo Raceway (*RW-FBR*) iluminado con diodos de emisión de luz (*LED*) para el cultivo de microalgas fotosintéticas en general y dinoflagelados en particular.

Ese tipo de *FBR* se encuentra provisto de un dispositivo capaz simular regímenes de iluminación variando la duración del ciclo luminoso, la intensidad y espectro de la luz. De esta forma se puede proveer al microorganismo de una irradiancia específica que permitiera maximizar la producción de biomasa. Un parámetro importante en cualquier tipo de *FBR* lo constituye la mezcla. Por medio de la mezcla se homogeniza el medio maximizando la disponibilidad de nutrientes. Los dinoflagelados presentan una elevada sensibilidad a la turbulencia. Valores altos de turbulencia ocasionan daños estructurales que pueden desembocar en la lisis celular. Con el objeto de minimizar posibles daños celulares y optimizar la transferencia de nutrientes esenciales se realizó una caracterización fluidodinámica del dispositivo.

Se evaluó el dispositivo para el crecimiento del dinoflagelado *Amphidinium carterae* por medio del seguimiento de concentración celular y eficiencia fotosintética

del fotosistema II (Fv/Fm). *A. carterae* es un productor de amphidinolos (AMPs) los cuales presentan actividad hemolítica y antifúngica. Debido a la carencia de patrones de este tipo de moléculas se hace necesaria la evaluación de la actividad hemolítica de los AMPs para probar su existencia en el cultivo. Para acometer un optimización de un modo operacional se realizó el seguimiento del consumo de macronutrientes como son el fosforo y el nitrógeno.

1.4. Plan experimental

El trabajo de investigación realizado se llevó a cabo de acuerdo con el plan experimental que se muestra en el siguiente diagrama de Gantt. Se expone las tareas realizadas en cada fase del trabajo así como el número de horas empleadas para realizar cada actividad.

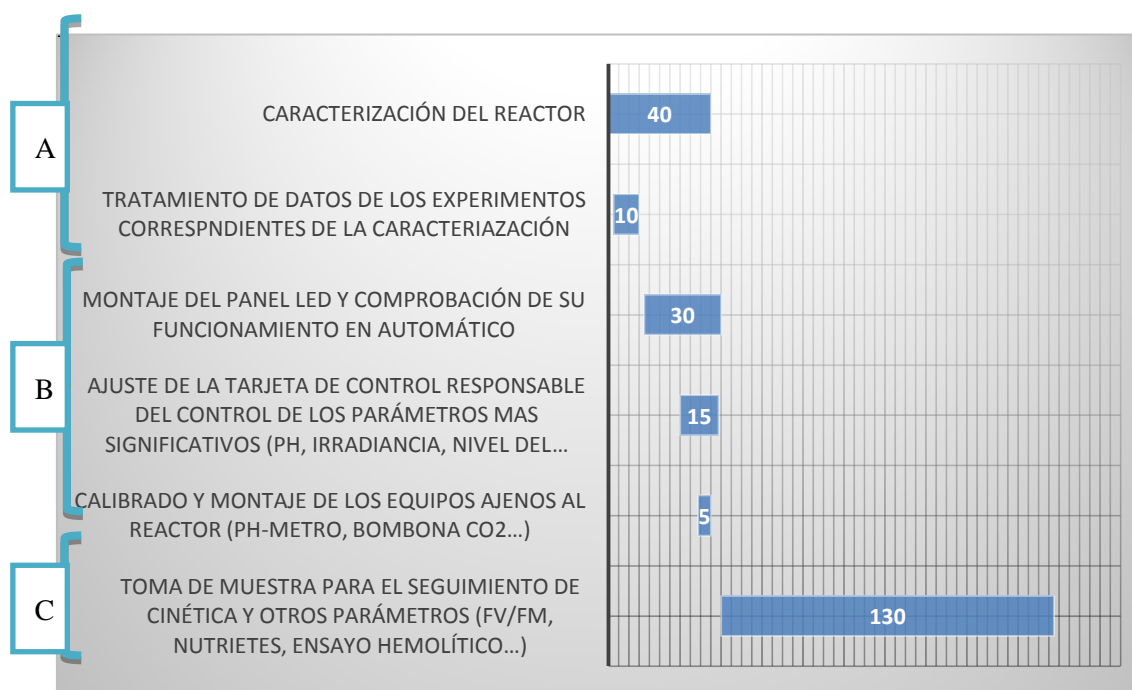


Figura 1. Diagrama de Gantt de las actividades realizadas en las distintas fases de realización de trabajo

Fase A: Caracterización del *FBR Raceway*

En esta primera etapa se afronta la caracterización fluidodinámica del *RW-FBR*. Este tipo de dispositivo posee poca profundidad y los extremos semicirculares. Se han estudiado los efectos de la velocidad de paletado y altura de líquido en la velocidad y tiempo de circulación del líquido y el tiempo mezclado en el *FBR* [19].

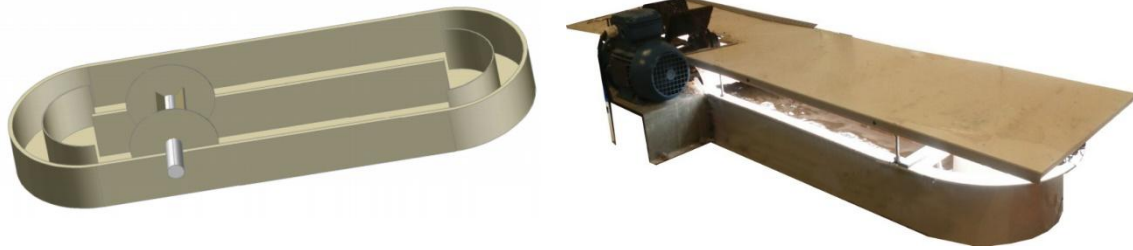


Figura 2. Dispositivo Raceway

Fase B: Montaje panel LED y controladores del *FBR*

Debido a que *A. carterae* es un dinoflagelado fotosintético es necesario el montaje de un panel de iluminación que le provea de luz suficiente para llevar a cabo sus funciones vitales. Se realizó el montaje de un panel integrado por tiras LEDs compuestas por diodos tipo rojo, verde, azul y blanco cálido (RGB-WW). El control del pH se realizó por medio de inyección de CO₂ a demanda. Debido a la evaporación producida en el *FBR* se implementó un sistema de control de nivel integrado por un sensor de nivel óptico y una bomba peristáltica que reponía el nivel del cultivo con agua destilada estéril.

Fase C: Cultivo de *A. carterae*

A. carterae fue cultivada en dos fases. Una primera fase en modo discontinuo. Una vez alcanzado el estado estacionario, se procedió en una segunda fase a trabajar en fed-batch (consistente en la extracción periódica de un pequeño volumen de cultivo y la reposición de éste por agua de mar enriquecida con una concentración de nutrientes equivalente a la necesitada para todo el volumen del *RW-FBR*). Durante el periodo de cultivo se tomaron muestras para realizar diferentes análisis según se indica en la sección de Materiales y Métodos.





2. Revisión Bibliográfica

Los procesos fototróficos permiten producir biomasa de forma autónoma por lo que se ha estado estudiando diferentes alternativas para su cultivo. Estos procesos utilizan la luz del sol como fuente de energía. Comparando las microalgas con las plantas terrestres se observa que las microalgas son capaces de convertir mayor cantidad de luz en biomasa.

En cualquier proceso biotecnológico se debe prestar atención al desarrollo de *FBRs* y la definición de las condiciones de operación que maximicen crecimiento y/o la producción de las sustancias de interés minimizando los costes de operación. Para la fijación de las condiciones óptimas de operación son necesarios datos cinéticos de crecimiento que se encuentra influenciados por la intensidad lumínica recibida, entre otros parámetros. Desafortunadamente, las condiciones de operación del *FBR*, especialmente la luz, no siempre pueden ser controlados de forma apropiada. La disponibilidad de la luz es el principal problema de los procesos fototróficos por el efecto del sombreado mutuo entre células.

La regulación de la luz incidente es crucial en los procesos de cultivo de microorganismos fotosintéticos ya que, dependiendo de la longitud de onda, el espectro y la intensidad, el crecimiento y la composición bioquímica de estos organismos varía. Hasta la fecha se utilizaban de forma generalizada lámparas fluorescentes como fuente de iluminación, pero debido a su amplio espectro de emisión no podían ser estudiadas adecuadamente.

El uso actual de diodos emisores de luz (*LEDs*) en el cultivo de microorganismos fotosintéticos se justifica debido a que posibilita diseños flexibles de *FBRs* pudiendo modular la banda de emisión de la luz de los *LEDs* y aportando de esta manera un espectro lumínico específico.

2.1. Iluminación

La luz natural, o aportada de forma artificial, es un parámetro fundamental para el desarrollo de los organismos fotosintéticos. La energía recibida por estos microorganismos fotoautótrofos es una función de la densidad del flujo fotónico (*PPFD*) que alcanza la superficie del cultivo. En el caso de las microalgas, las células absorben solo una fracción del total del flujo, dependiendo de la densidad celular del cultivo, de



las propiedades ópticas de las células, de la longitud del paso óptico del *FBR* y de la eficiencia del mezclado. Los fotones que no son absorbidos por los centros de reacción fotosintéticos disipan su energía en forma de calor o bien pueden ser reflejadas.

Las microalgas, al igual que las plantas, asimilan carbono inorgánico para convertirlo en materia orgánica, utilizando la luz como fuente de energía en el proceso. Numerosos estudios realizados con microalgas han demostrado que la intensidad de la luz afecta el patrón de síntesis macromolecular a partir de CO₂ fijado en la fotosíntesis [20]. Cuando las células se desarrollan en presencia de ciclos de luz-oscuridad, la síntesis de proteínas y otras macromoléculas continúa durante el periodo de oscuridad, a expensa de carbono y la energía almacenados en los carbohidratos.

En cultivos de microalgas, la concentración celular juega un papel muy importante en la cantidad de luz recibida por las células. A altas densidades celulares se ha de aumentar la intensidad de luz, con objeto de aumentar su penetración a través del cultivo para que pueda ser utilizada de forma eficiente y tratar de evitar, en lo posible, el efecto *pantalla* producido por las propias células y la producción de una clorofila antena menos eficiente en la captación de luz [21]. No obstante, intensidades de luz demasiado altas pueden provocar fotoinhibición del crecimiento y aumentar la temperatura del cultivo.

La respuesta cinética de un cultivo de microalgas en función de la intensidad luminosa se puede explicar como sigue: a una intensidad de luz muy baja, la baja tasa de crecimiento resultante se equilibra con la disminución de la densidad celular y el crecimiento neto es cero (punto de compensación). A intensidades de luz mayores, el crecimiento se acelera de forma que la pendiente inicial de la curva representa la máxima eficiencia del crecimiento en respuesta a la luz. Si seguimos aumentando la intensidad de luz se alcanza un punto que representa el nivel de saturación, en el que la tasa de crecimiento es ya la máxima alcanzable. Un incremento de la intensidad de luz por encima de ese punto no da lugar a un incremento en la tasa de crecimiento. En esta situación, la intensidad de luz puede llegar a ser perjudicial para el cultivo y producir el fenómeno de fotoinhibición, algo que se manifiesta inicialmente por una disminución en la tasa de crecimiento y que, en casos extremos, provoca la muerte celular.

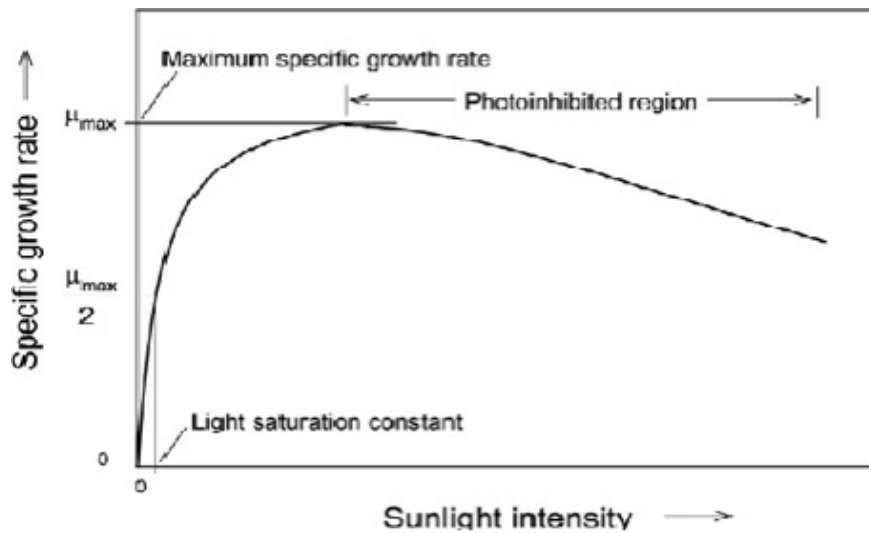


Figura 3. Relación entre velocidad específica de crecimiento y disponibilidad de luz.
 Fuente: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-3---cinetica-del-crecimiento-de-microalgas/3-1-crecimiento-y-luz.html>

Ante intensidades de luz muy bajas, las microalgas incrementan su contenido celular de clorofila *a* y otros pigmentos especializados en la recolección de luz como clorofila *b*, clorofila *c*, ficobiliproteínas y carotenoides. Esta situación ocurre en gran parte en la zona fótica, donde la intensidad luminosa disminuye exponencialmente con la profundidad del cultivo y hace que pigmentos accesorios como carotenoides, ficobiliproteínas y clorofilas asuman funciones importantes en la absorción de energía luminosa. Por el contrario, en respuesta a una alta intensidad de luz las microalgas disminuyen su contenido celular de clorofila *a* y otros pigmentos directamente implicados en la fotosíntesis, mientras que se incrementa el contenido en determinados carotenoides que ejercen funciones fotoprotectoras ante intensidades luminosas que pudieran perjudicar el aparato fotosintético celular.

En un estudio realizado M. Glemser y cols. [22] se muestra la actual disponibilidad y aplicación de la tecnología *LED* como fuente de iluminación en *FBRs*. A continuación se muestran las características destacables de los *LED*.

El LED es direccional. Al contrario que el tubo fluorescente que emite luz en todas las direcciones. Por este motivo los tubos tradicionales necesitan reflectantes para aprovechar la luz que va hacia la parte del techo. Esto hace que el *LED* sea aún más eficiente.



Mayor eficacia energética. La iluminación *LED* se diferencia de las demás bombillas por consumir entre un 80 y 90% menos de electricidad que una bombilla incandescente tradicional y un 65% menos de electricidad que una bombilla de bajo consumo de tecnología fluorescente. Con las lámparas *LED* se ha conseguido la mayor eficiencia lumínica, llegando hasta 130-150 lúmenes por vatio en las bombillas más eficientes. Como ejemplo la eficiencia lumínica de un halógeno es tan solo de 20 a 25 lúmenes por vatio.

Reducido tamaño. Gracias al pequeño tamaño pueden montarse en diferentes configuraciones (paneles, tiras, cilindros, o pequeñas esferas). Por lo tanto, los FBRFBs deben diseñarse caso sin ninguna limitación respecto a las dimensiones espaciales de la fuente de iluminación. La generación de luz colimada permite la simulación de rayos naturales de luz [23].

Mayor vida útil. La vida media de una lámpara *LED* se sitúa en torno a las 45.000 horas frente a las 2000 horas que una bombilla estándar ofrece. El dato salta a simple vista, con una lámpara *LED* tendríamos cinco años de luz continuada, 24 horas al día y 7 días a la semana; frente a los 83 días de la bombilla estándar.

Baja energía de disipación radiante. Los *LEDs* convierten parte de la energía en calor, el calor es producido en la unión de las dos capas de semiconductores y pueden tener un impacto negativo en la vida útil del dispositivo [24]. Para evitar problemas de sobrecalentamiento, los *LED* se montan sobre un disipador de calor, el cual se une tanto a los *LED* como a las placas de los circuitos, las posteriores conexiones permiten una disipación de calor eficiente mediante la conducción de la capa activa a la parte posterior del *LED*. Como resultado, la energía eléctrica restante que llega al *LED* no se convierte en calor, pero se emite como luz. Gracias a esto se pueden colocar mucho más cerca del sistema de cultivo sin dañar a las células [25].

Son más ecológicas. Las bombillas normales contienen tungsteno y los fluorescentes mercurio, productos tóxicos. Los *LED* son reciclables y cumplen con la normativa europea de sustancias contaminantes.

Longitud de onda de emisión conocida y amplia variedad disponible. Los *LED* son semiconductores sólidos que producen luz en un rango muy estrecho de longitud de onda. El ancho de banda del rango de emisión está generalmente entre 10 y 30 nm. Con



estas propiedades, determinadas partes dentro de la región fotosintéticamente activa (*PAR*) pueden estudiarse individualmente, y así puede conocerse la respuesta fotosintética de un organismo específico. Los rangos de absorción principales en la *PAR* dependen de la composición individual de clorofilas y carotenoides [26]. Los fotones de la luz azul tienen longitudes de onda más cortas y contienen alrededor de un 40 % más de energía. Estos fotones cargados de energía pueden elevar los electrones de los pigmentos fotocaptadores directamente a su segundo estado de excitación, donde los electrones vuelven a su estado original después de haber pasado la energía a los componentes de los fotosistemas I y II, respectivamente. Por lo tanto, la luz azul tiene un papel regulador en el crecimiento y metabolismo de las células [27]. Los nuevos avances tecnológicos proporcionan *LED* con rangos de longitudes de onda entre 250 y 1100 nm. Con esta versatilidad técnica, las simulaciones realizadas con luces *LED* ya no están limitadas a *PAR* de la luz solar.

Bajo mantenimiento. La larga vida de los productos *LED* evitan tener que estar realizando un mantenimiento frecuente.

Regulación electrónica. Los *LEDs* pueden regularse utilizando la modulación de ancho de pulsos (*PWM*) o mediante la reducción constante de corriente (*CCR*). El primero se basa en ciclos rápidos on-off de los diodos resultando en una densidad de flujo fotónico global más baja. En el segundo método, la corriente incidente se ve reducida mediante un regulador. Por lo tanto, se produce un flujo fotónico continuo con un máximo de salida más bajo. EL *CCR* puede utilizarse con controladores programables, los cuales proporcionan una forma eficiente de establecer y ajustar las intensidades de la luz [28]. Esto permite una implementación eficiente de ciclos luz-oscuridad casi naturales y gradientes de intensidades de luz. Además, estas propiedades pueden usarse para estudiar las respuestas intracelulares a la luz y los mecanismos fotoadaptativos [29], [30].

De forma generalizada se ha utilizado la combinación *LEDs* blancos con rojos y/o azules para estudiar los efectos de la calidad de la luz. En algunos estudios se incorporan además *LEDs* verdes para especificar la respuesta de crecimiento dependiendo de la luz con la iluminación fuera del máximo de absorción de la clorofila. Los sistemas de iluminación comerciales de *FBRs* utilizan *LEDs* blanco-cálidos que difieren en el espectro *PAR* comparado con la luz solar [23], [31]. En la actualidad, sólo



en unos pocos estudios se han simulado las condiciones de la luz solar, utilizando varios *LEDs* distribuidos sobre todo el *PAR* [32], [33], [34]. Se han implementado diferentes regímenes de luz entre la iluminación constante (*C*) y la iluminación luz-oscuridad (*L/D*) que normalmente consiste en 16:08 ó 12:12 horas (luz:oscuridad). También se han llevado a cabo estudios que evalúan los efectos de la iluminación intermitente (que técnicamente hablando se trata de un régimen luz/oscuridad) en el apartado fotosintético de las células fotoautótrofas.

En un *FBR* donde los niveles de iluminación y nutrientes suelen ser uniformes, los ritmos naturales pueden fallar y el comportamiento metabólico puede ser bastante diferente al comportamiento en la naturaleza. Se cree que la mayoría de las divisiones celulares realizadas por mitosis, tienen lugar durante la noche, por lo que períodos de luz muy largos pueden llegar a provocar que no se realice la división en algunos dinoflagelados. El fotoperiodo al que son sometidos los dinoflagelados determina el número de divisiones celulares y el crecimiento ya que la duración del periodo oscuro limita el número de divisiones celulares y la duración del periodo de luz limita la cantidad de energía que obtiene la célula para llevar a cabo sus funciones celulares. El régimen de fotoperiodo óptimo se encuentra entre ciclos de 16:8 y 14:10 horas de *L/D* respectivamente.

2.2. Temperatura

La temperatura afecta al crecimiento y a la composición bioquímica de las microalgas. La ausencia de crecimiento a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones enzimáticas y al cambio de estado de los lípidos de membrana, ya que a bajas temperaturas se rigidiza la membrana, impidiendo el normal funcionamiento esta. El incremento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas, aunque temperaturas muy altas pueden provocar la desnaturalización de las proteínas, alteraciones irreversibles en las membranas lipídicas y, en otro término, la muerte celular (ver Fig. 4)

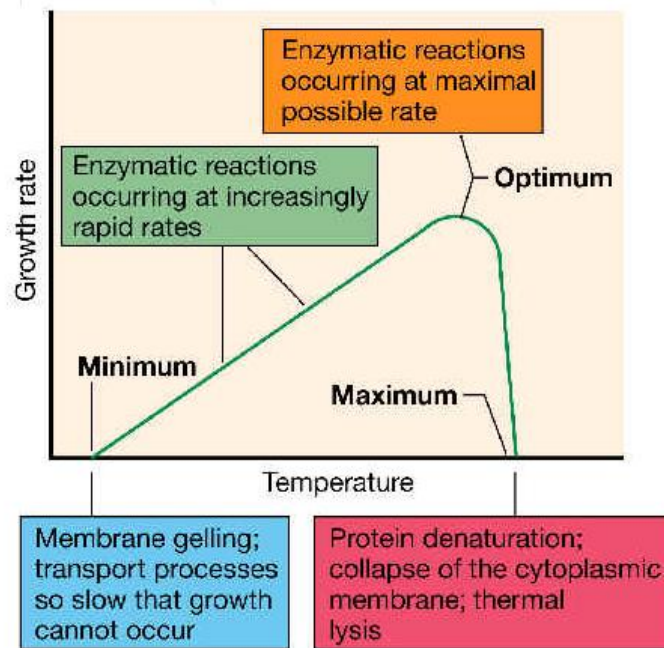


Figura 4. Curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura, donde podemos distinguir tres puntos característicos llamados temperaturas cardinales Fuente: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm>

En relación a lo anterior, el efecto de la temperatura sobre la composición de las membranas lipídicas y su contenido en ácidos grasos está bien estudiado. Generalmente, una disminución en la temperatura por debajo de su valor óptimo incrementa el grado de insaturación de los sistemas lipídicos. Esta respuesta mejora la estabilidad y fluidez de las membranas celulares, en particular las membranas tilacoidales, con objeto de proteger la maquinaria fotosintética de la vulnerabilidad provocada por las bajas temperaturas [35].

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento diferente [36]. A temperaturas óptimas para el crecimiento, las microalgas tienen el mínimo tamaño celular y el mínimo contenido en carbono y nitrógeno, mientras que provocar incrementos en el volumen celular y modificaciones en la composición química [37]. En otras palabras, se requiere más carbono y más nutrientes para producir una célula a la misma tasa de crecimiento a una temperatura no óptima.

En determinadas condiciones de cultivo puede ser necesario disminuir la temperatura de los cultivos utilizando un flujo de agua fría o controlar la temperatura del aire de la cámara de cultivo con sistemas de refrigeración. En el *RW-FBR* se instaló



un intercambiador de calor interno, con el fin de refrigerar el cultivo debido al calor generado por el panel de *LEDs*,.

2.3. pH

El pH es otro de los factores que puede afectar de forma importante al crecimiento de las microalgas. Cada microorganismo solo puede crecer en un rango estrecho de pH, fuera del cual mueren rápidamente. En ocasiones, el pH intracelular de las microalgas, situada en torno a 7, es distinto al del medio de cultivo.

Aunque el rango de pH necesario para el cultivo de la mayoría de las especies de microalgas se encuentra entre 7 y 9, la captación de carbono inorgánico por el fitoplancton durante la fotosíntesis provoca un aumento del pH en el medio que le rodea. Este pH puede alcanzar un valor de hasta 10 unidades en ecosistemas de agua dulce, mientras que en el agua de mar permanece constante (alrededor de 8.2), debido a la concentración de carbono inorgánico existente que actúa como tampón [38]. La adicción de CO₂ al medio de cultivo permite corregir los altos valores de pH que pueden alcanzarse durante el periodo de crecimiento de las microalgas, a la vez que provoca una disminución muy acusada del pH del medio puede llegar a tener un efecto adverso sobre la fisiología celular.

En el *RW-FBR* se ha incorporado una sonda de pH que mediante un controlador y un inyector de CO₂ es el responsable de mantener el pH del cultivo de forma más constante posible. Está programado de forma que si supera un pH de 8.5 inyecte pulsos de CO₂ puro.

2.4. Agitación

El sistema de mezclado llega a convertirse en un punto fundamental, debe permitir condiciones homogéneas, favorecer la transferencia de nutrientes, dispersión uniforme entre las zonas oscuras e iluminadas, transferencia de energía, romper gradientes de difusión en la superficie celular, retirar el oxígeno fotosintético generado, evitar estratificación térmica ya que puede existir amplitud térmica entre fondo y superficie del *FBR* de hasta 8° C [39]. Mezclas inadecuadas no satisfacen los requerimientos anteriormente mencionados, pueden además promueven formación de aglomerados celulares que disminuyen la velocidad de transferencia de masa comprometiendo la



viabilidad celular. Por esto, la selección del régimen de mezcla es crítico para obtener altas producciones de biomasa [40].

Para evitar daños celulares en la mayor medida posible, el RW-FBR fue caracterizado desde el punto de vista fluidodinámico a través del tiempo de circulación del cultivo, velocidad del líquido y tiempo de mezcla.

2.5. Estrés hidrodinámico en cultivos

La mezcla y aireación crean una gran diversidad de campos de fuerzas de corte y fenómenos asociados a la interacción célula-mezclador y/o célula-burbuja en cualquier tipo de *FBR* agitado y/o aireado. El estrés hidrodinámico producido por la agitación y mezcla toma gran relevancia cuando se trata de células frágiles porque se tiene que llegar a soluciones de compromiso entre la disminución de velocidad de crecimiento por inhibición debida a la fuerza de corte y aumento de la velocidad de crecimiento por la mejor de las propiedades de transporte en el *FBR*. La situación se torna más compleja cuando las células frágiles a cultivar son fotoautotróficas y requieren iluminación para su crecimiento, ya que sin mezcla se estratificarían y provocarían gradientes de iluminación en el interior del *FBR*. En este sentido la mezcla y la fluidodinámica adquiere una extraordinaria relevancia porque son las responsables de transportar células desde zonas menos iluminadas en el centro del *FBR* hasta zonas próximas a la superficie sobradamente iluminadas además de homogeneizar el medio para proporcionar accesibilidad nutricional a todas las células. El cultivo masivo de dinoflagelados fotoautotróficos, como la especie cultivada en este *TFG*, se encuentra en esta última y compleja situación [41].



3. Materiales y métodos

3.1. Microalga

Se utilizó la microalga marina *Amphidinium carterae* para el cultivo en el *RW-FBR*. El inoculo fue preparado en matraces erlenmeyer a 21 ± 1 °C iluminado con lámparas fluorescentes de 58 W que aportaban $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en ciclos luz-oscuridad de 12-12 horas. El medio de cultivo usado fue F/2 preparado con agua de mar del mediterráneo esterilizada y filtrada ($0.22 \mu\text{m}$ filtro Millipore; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

3.2. Sistema de cultivo

Un FBR tipo *Raceway* (*RW-FBR*) con un largo del canal de 112.5 cm, siendo la longitud total de 143.5 cm, el ancho total es de 31 cm y el ancho del canal es de 15 cm. El dispositivo se encuentra provisto de una superficie cubierta de tiras *LEDs* multicolor *RGBW* (rojo, verde, azul y blanco cálido).



Figura 5. a) Vista general del FBR b) Vista detallada del panel LED

Para asegurar que la configuración *LED* es capaz de proporcionar luz utilizable fotosintéticamente para el *FBR*, el espectro de las luces *LED* fue comparado con el espectro de la luz solar en el rango de la longitud de onda y la región fotosintéticamente activa (*PAR*) entre 400 y 700 nm. Para esto, en el rango de absorción de los pigmentos relevantes, el contenido de energía de la luz solar y de las luces *LED* fue calculado y comparado con la energía *PAR* total de salida de fuente de luz en particular. La metodología relevante ha sido descrita con anterioridad [23]. La iluminación *LED* imitaba la luz solar de acuerdo a la ecuación 1.

$$I_o(t) = \begin{cases} I_{o\max} \sin \left[\pi \frac{t - t_{sr}}{t_{ss} - t_{sr}} \right] & \text{if } t_{sr} \leq t \leq t_{ss} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

Donde $I_{o\max}$ es la máxima irradiancia en el fondo del *RW-FBR* en la mitad del ciclo cuando el dispositivo se encontraba lleno de medio de cultivo; t_{sr} es la hora de amanecer (6 h); y t_{ss} es la hora del ocaso (18 h).

El *FBR* dispone de un intercambiador de calor para asegurar que la temperatura del cultivo sea 21 ± 1 °C. Para evitar la limitación por carbono se controla el valor de pH a 8,5 por medio de aporte automático de dióxido de carbono (CO_2) a demanda. Para dispersar el burbujeo y aumentar la transferencia de materia del CO_2 el burbujeador fue situado en un punto cercano a la paleta. El *RW-FBR* fue esterilizado químicamente por medio de lejía comercial que posteriormente fue neutralizada con tiosulfato sódico.

Para el cultivo de *A. carterae* se usó el medio F/2 preparado con agua de mar esterilizada mediante filtración procedente del Mediterráneo. El inóculo usado contenía *A. carterae* en fase de crecimiento exponencial con una concentración celular inicial $100000 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ que permitió obtener una concentración inicial en el *FBR* de alrededor de $30000 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para evitar efectos de fotoinhibición en los primeros momentos de cultivo se ajustó el valor de irradiancia máxima en superficie a $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante los primeros días. Pasados estos primeros días de adaptación se procedió a aumentar la irradiancia máxima hasta $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El modo operacional inicialmente seleccionado fue tipo batch. Una vez alcanzado un primer estado estacionario en el que se detectó déficit nutricional la estrategia de cultivo cambió a modo feed-batch suplementando el cultivo con stock concentrado de nutrientes que restituían las concentraciones de estos a valores iniciales.

3.3. Caracterización fluidodinámica del FBR

La caracterización fluidodinámica del *FBR* se acometió por medio de ensayos de estímulo-respuesta a distintas velocidades de paleteado. Se inyectaron pulsos de 40 mL de disolución saturada de hidróxido de sodio (2.5 mol L^{-1}) registrándose la variación de pH. Una vez estabilizado, se vacía el reactor y se vuelve a rellenar con agua de mar fresca. El punto de inyección estaba situado antes de la pala. La respuesta a este pulso



fue medido por sondas de pH (Crison) posicionadas en dos zonas del reactor (Fig. 10). Conectado a transmisores y software de adquisición de datos (DaqFactory). Añadir el pulso en esta posición fue optimizada previamente para mejorar la precisión de la medida, mientras la localización de las sondas fueron escogidas para permitir la caracterización total del reactor.

El tiempo de circulación en el *FBR* se determinó a partir de los intervalos de tiempo entre picos consecutivos de pH en un lugar. La velocidad del líquido se determinó como la relación de la distancia de recorrido en el *FBR* al tiempo de circulación (322 cm). El tiempo de mezcla se definió como el tiempo requerido para que las variaciones de pH alcanzaran menos del 5% del valor estable final [19].

Para obtener esto como se muestra en la Fig. 6 y 7 para determinar el tiempo de mezcla se usó el método de pulsos. A pesar de que la amplitud de los picos fue decreciendo a lo largo del tiempo, su definición era suficiente para permitir cuantificar los parámetros. Los diferentes ensayos de realizando variando la velocidad de paletado (desde 9 hasta 36 rpm), además de variar la posición de las sondas a lo largo de la profundidad del reactor (desde el fondo del reactor hasta una altura de 1.5 cm de la superficie), para poder estudiar el efecto de la dispersión axial a lo largo del fondo del reactor.

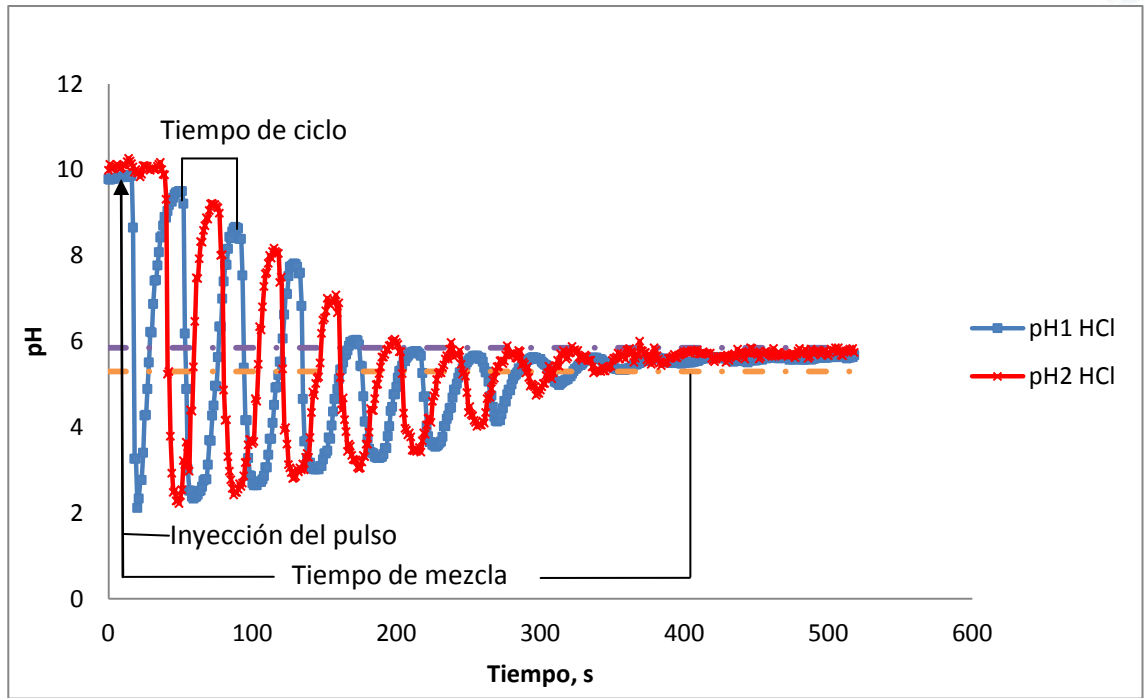


Figura 6. Resultados de un experimento con velocidad de paletado con frecuencia de motor de 8 Hz (9 rpm) y con la sonda posicionada en el fondo del reactor.

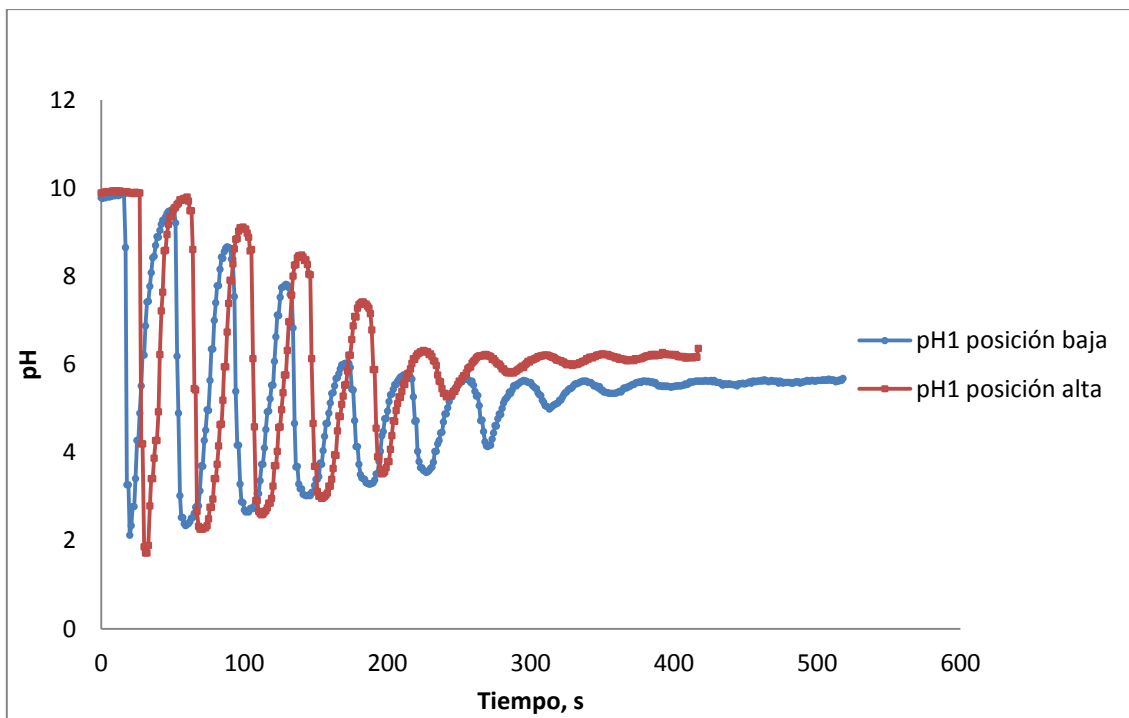


Figura 7. Variación de la respuesta en función de la posición de la sonda de pH.

3.4. Métodos cuantitativos para medir el crecimiento

Existen varios métodos cuantitativos, directos o indirectos, para la medida del crecimiento de las microalgas. Los métodos directos se basan en la medida de parámetros como el número de células vivas. Los métodos indirectos se basan en la medida de diversos parámetros de cultivo, elegidos en función de las características del mismo, que nos permitirán extraer información sobre la evolución del número de microorganismos.

3.4.1. Citometría de flujo

Por medio de esta técnica se determinaron las siguientes variables: concentración celular, diámetro celular medio e intensidades medias de fluorescencia a determinadas longitudes de onda. Las medidas citométricas se realizaron con el citómetro de flujo tipo CellLabQuanta SC (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) el cual está equipado con un láser de excitación iónica de argón (luz azul, 488 nm) y 3 fotomultiplicadores: FL₁ (525 nm), FL₂ (575nm), FL₃ (670 nm en adelante). Fueron analizadas al menos 60000 células por muestra. El caudal se mantuvo en un nivel moderado para evitar una interferencia entre las células. La fluorescencia de las células se fue verificando con el microscopio epifluorescente (Nikon Eclipse 80i; Nikon Inc. Garden City, NY; USA).



Figura 8. Citómetro de flujo. CellLabQuanta SC (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)

3.5. Medida de nutrientes

Se llevó a cabo un seguimiento de los macronutrientes esenciales, Nitrógeno y Fosforo; del sobrenadante. Parea realizar este seguimiento se centrifugaron las muestras



separándose el sobrenadante del pellet celular. Una vez obtenido el sobrenadante se determinaron ambos nutrientes por técnicas espectrofotométricas.

3.5.1. Determinación Nitratos

Medidas de absorción UV a 220 nm permite la determinación rápida de NO_3^- . Debido a que la materia orgánica absorbe en 220 nm, sin embargo, no absorbe a 275 nm, una segunda medida realizada a 275 nm puede usarse para la corrección del valor de NO_3^- . El grado de corrección empírica está relacionado con la naturaleza y la concentración de materia orgánica y puede variar.

Fundamento del método:

1. Tratamiento de la muestra. Las medidas son realizadas al sobrenadante, por lo que la muestra tomada debe ser centrifugada durante 8 min y a una velocidad de 2800g para separar el pellet del sobrenadante.
2. Preparación de la recta de calibrado. Se preparan estándares de calibración de NO_3^- de un rango de 0 a 7 mg N/L. Se realizan las mismas medidas a los patrones de NO_3^- que a las muestras.
3. Medida en el espectrofotómetro. Lectura de absorbancia o transmitancia de agua destilada fijando en cero la absorbancia y 100% la transmitancia. Se usa una longitud de onda de 220 nm para obtener una lectura de NO_3^- y una longitud de onda de 275 nm para determinar interferencias debido a la materia orgánica.
4. Tratamiento de datos. Tanto para las muestras como para los patrones de la recta de calibrado, se resta dos veces la absorbancia obtenida a 275 nm de la absorbancia obtenida a 220 nm para obtener la absorbancia de NO_3^- . Para la recta de calibrado se representa la absorbancia de NO_3^- en función de la concentración conocida del patrón. A partir de esta recta se obtiene el valor de la concentración de las muestras.

3.5.2. Determinación Fosfatos

Las especies de fósforo disueltas en el sobrenadante fueron determinadas y cuantificadas como PO_4^{3-} , de acuerdo al método publicado por la American Public Health Association [43]. El producto de reacción se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 885 nm.



Fundamento del método:

El ácido molíbdico y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en un medio ácido con soluciones diluidas de ortofosfato para formar ácido fosfomolíbdico que es reducido por el ácido ascórbico desarrollándose una coloración azul que es medida en espectrofotómetro. Esta técnica da resultados reproducibles y tiene la ventaja de necesitar un solo reactivo de reducción. Las disoluciones, preparadas en agua destilada, fueron:

- a) Ácido molíbdico: $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- b) Ácido sulfúrico: $1.35 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.
- c) Ácido ascórbico: $38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- d) Tartrato de antimonio y potasio: $1.36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Con las disoluciones anteriores se preparó un reactivo mixto que es estable durante al menos 4 h. Las proporciones en volumen de las anteriores disoluciones en el mismo son las que aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporciones en volumen de las disoluciones en el reactivo mixto

Ácido molíbdico	22,20%
Ácido sulfúrico	44,40%
Ácido ascórbico	22,20%
Tartrato	11,10%

Las muestras de cultivo se centrifugan durante 8 min a 2800g. A continuación, se recupera el sobrenadante y se diluye (el método es lineal entre 5-30 μM). A un mL de muestra diluida se le añaden 200 μL de reactivo mixto. Tras 10 min de reacción a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 885 nm.

3.6. Medida de actividad hemolítica

Con el objeto de tener noción del contenido en amphidinolos (*AMPs*) se realizó un seguimiento de la capacidad que presentan este tipo de sustancias para lisar los glóbulos rojos. Debido a la carencia de patrones de este tipo de moléculas se hace necesaria la evaluación de la actividad hemolítica de los *AMPs* para probar su existencia en el cultivo.

Para esta medida se usa el pellet celular que es previamente extraído con metanol. Una vez obtenido el extracto metanólico se pone en contacto una cantidad de éste (previa evaporación del metanol) con eritrocitos. Transcurridas 24 horas de



incubación a 20°C se evalúa la lisis de los glóbulos rojos. Los resultados obtenidos se comparan con la respuesta exhibida por un ensayo control (agua destilada y eritrocitos) el cuál produce un 100% de lisis.

3.7. Cinética de Crecimiento

Los cultivos en modo batch y semicontinuo muestran curvas de crecimiento asimétricas. Se recurrió a la siguiente ecuación logística asimétrica para representar la concentración celular ($N(t)$) en función de los datos del tiempo (t) para determinar con exactitud la tasa de crecimiento específica:

$$N(t) = a + \frac{b}{\left[1 + \exp\left(-\frac{(t-c)}{d}\right)\right]} \quad (2)$$

Donde a, b, c y d son constantes. La tasa específica de crecimiento celular μ (día⁻¹) se calculó usando la curva que mejor se ajustaba a la ecuación. Por tanto:

$$\mu(t) = \frac{1}{N(t)} \left(\frac{dN(t)}{dt} \right) \quad (3)$$

3.8. Eficiencia Fotosintética

La relación entre la fluorescencia máxima variable (F_v) y la fluorescencia máxima (F_m) de la clorofila (F_v/F_m) representa el máximo rendimiento en la producción fotoquímica del fotosistema II. Esta proporción es generalmente aceptada como un indicador del estrés celular. Los valores de F_v/F_m fueron determinados usando un fluorímetro de clorofila (Mini-PAM-2500; Heinz Walz GmbH, Efeltrich, Alemania) la luz pulsada (PAM).

Las muestras se mantienen en la oscuridad durante 30 minutos antes de realizar las mediciones para poder determinar los parámetros fotosintéticos. La fluorescencia inicial (F_0) fue medida mediante la exposición de las células a la luz roja bajo pulso (<1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La fluorescencia máxima (F_m) se cuantificó aplicando un pulso de luz



saturante ($8000 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$; 800 ms ancho de impulso) La fluorescencia máxima variable fue calculada como $Fv = Fm - F_0$.

3.9. Campo de irradiancias dentro del FBR

Para el modelo del campo de irradiancia dentro del *FBR*, la luz emitida por cualquier *LED* fue considerada como isotrópica, i.e. el nivel de irradiancia se consideró independiente a la dirección de emisión desde cualquier punto en la superficie de un *LED*, como ha sido demostrado [44].

El promedio diario de la irradiancia media fue calculado. El primer paso consistió en el cálculo del coeficiente de atenuación debido a la suspensión microalgal, γ (m^{-1}), a varios tiempos de cultivo por medida directa de la irradiancia en el fondo del *RW-FBR* ($I(L,t)$). Los valores de la irradiancia se midieron haciendo uso de un medidor de irradiancia 4π (Biospherical QSL 100; Biospherical Instruments Inc., San Diego, CA, USA). Los valores de $I(L,t)$ fueron sustituidos en la expresión (4) para calcular γ mediante iteraciones:

$$I(L, t) = \frac{I_0(t)}{\pi} \cdot \int_{-\pi/2}^{\pi/2} e^{-\gamma \cdot \frac{L}{\cos(\alpha)}} \cdot d\alpha \quad (4)$$

Donde L es la profundidad (m) del *RW-FBR*, α es el ángulo de penetración de la luz incidente y $I_0(t)$ es el valor temporal de irradiancia calculado con la ecuación (1). Se calcularon los valores de irradiancia media en el interior del *FBR* con la ecuación 5

$$I_{av}(t) = \frac{I_0(t)}{\pi \cdot L} \cdot \int_0^L \int_{-\pi/2}^{\pi/2} e^{-\gamma \cdot \frac{L}{\cos(\alpha)}} \cdot d\alpha \cdot dL \quad (5)$$

Finalmente, se usó el valor de $I_{ave}(t)$ para calcular el promedio diario de I_{ave} usando la ecuación 6.

$$Y_{av} = \frac{1}{24} \cdot \int_{t_{ss}}^{t_{sr}} I_{av}(t) \cdot dt \quad (6)$$



4. Fases de la realización del trabajo y su cronograma asociado

Fase 1: Caracterización del FBR *Raceway*

En esta primera etapa se afronta la caracterización fluidodinámica *RC-FBR*. Este tipo de dispositivo posee poca profundidad y los extremos semicirculares Fig. 5.

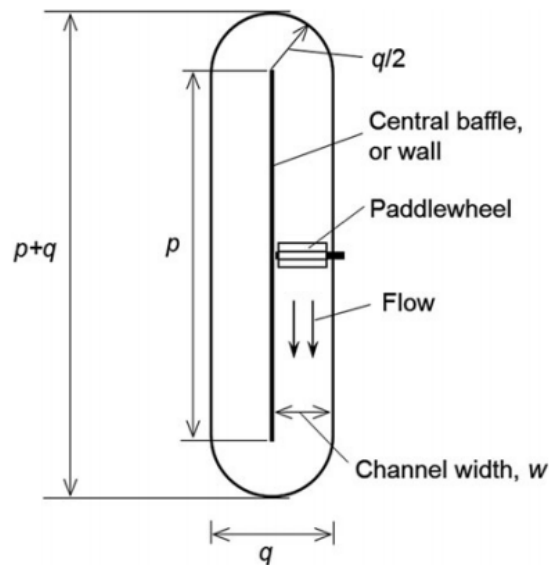


Figura 9. Esquema de un reactor *Raceway*

Las medidas del FBR *Raceway* son las siguientes:

$$p = 112.5 \text{ cm}$$

$$q = 31 \text{ cm}$$

Ancho del canal:

$$w = 15 \text{ cm}$$

Con estas medidas se obtiene la distancia que recorre el fluido en el *FBR*:

$$L_{total} = 275.39 \text{ cm}$$

Se han estudiado los efectos de la velocidad de paleteo y altura de líquido en la velocidad y tiempo de circulación del líquido y el tiempo mezclado en el *FBR* [19].

Son necesarias dos sondas pH conectadas a un equipo que se encarga de recoger la información captada por dichos sensores. La primera sonda era posicionada tras la

pala, como se indica en la Fig. 6. La inyección de CO₂ tenía lugar antes de la pala con el objetivo de favorecer la dispersión de las burbujas de CO₂. La segunda sonda era posicionada casi al final del recorrido del líquido, justo antes de la segunda curva.

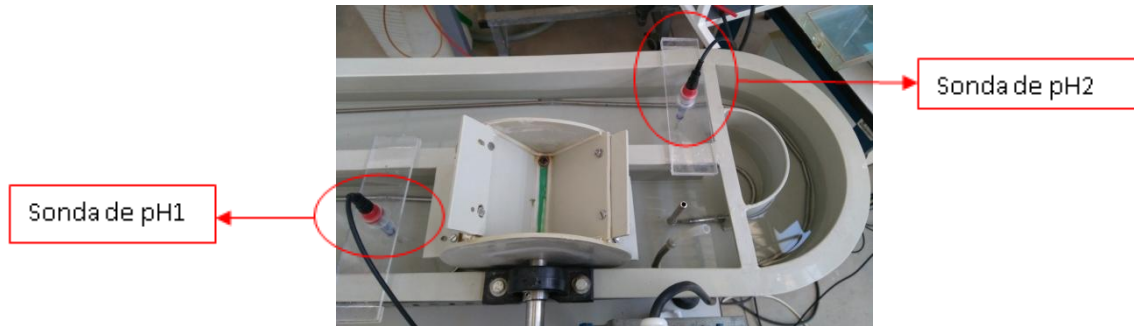


Figura 10. Posición sondas de pH

Se realizaron varios ensayos con agua de mar, a distintas velocidades de paleteo, desde una velocidad muy baja de 9 rpm (menos estrés hidrodinámico peor distribución) hasta una velocidad máxima de 36 rpm, donde el riesgo de daño por estrés hidrodinámico era elevado. La velocidad de paleteo se regulaba mediante un variador de frecuencia (Fig. 11). La relación entre frecuencia (Hz) y revoluciones por minuto (rpm) se muestra en la Tabla 3.



Figura 11. Variador de frecuencia

Tabla 3. Relación entre Hz y rpm

Frecuencia (Hz)	Revoluciones por minuto (rpm)
8	9
15	17
20	23
30	36



En cada ensayo se inyectó, de forma rápida y alterna, un pulso de NaOH de 40 mL de HCl de 40 mL. Las sondas iban registrando el pH, este oscila con una respuesta sobreamortiguada, una vez estabilizado se inyecta el pulso de ácido en el mismo punto. Al igual que en el anterior esperamos a que el pH se estabilice. Se procedió a realizar los mismos ensayos pero con la sonda de pH a distintas alturas (Centrado, pegado al fondo del *FBR* y a 1.5 cm de la superficie del líquido).

De esta forma se realizó un estudio sobre el efecto de dispersión axial del fluido. En este caso solo se modificará a altura de la sonda pH1.

Fase 2: Montaje panel LED y controladores del *FBR*

Debido a que *A. carterae* es un dinoflagelado fotosintético es necesario el montaje de un panel de iluminación que le provea de luz suficiente para llevar a cabo sus funciones vitales. Se realizó el montaje de un panel integrado por tiras *LEDs* compuestos por diodos tipo rojo, verde, azul y blanco cálido (RGB-WW). El grupo de investigación ha desarrollado un dispositivo que permite simular distintos regímenes de iluminación usando luces *LED*. El panel *LED* se encuentra situado horizontalmente sobre el *RW-FBR* a una altura de 7 cm desde el nivel del líquido. A esta altura el panel diseñado es capaz de aportar un nivel de irradiancia máxima de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

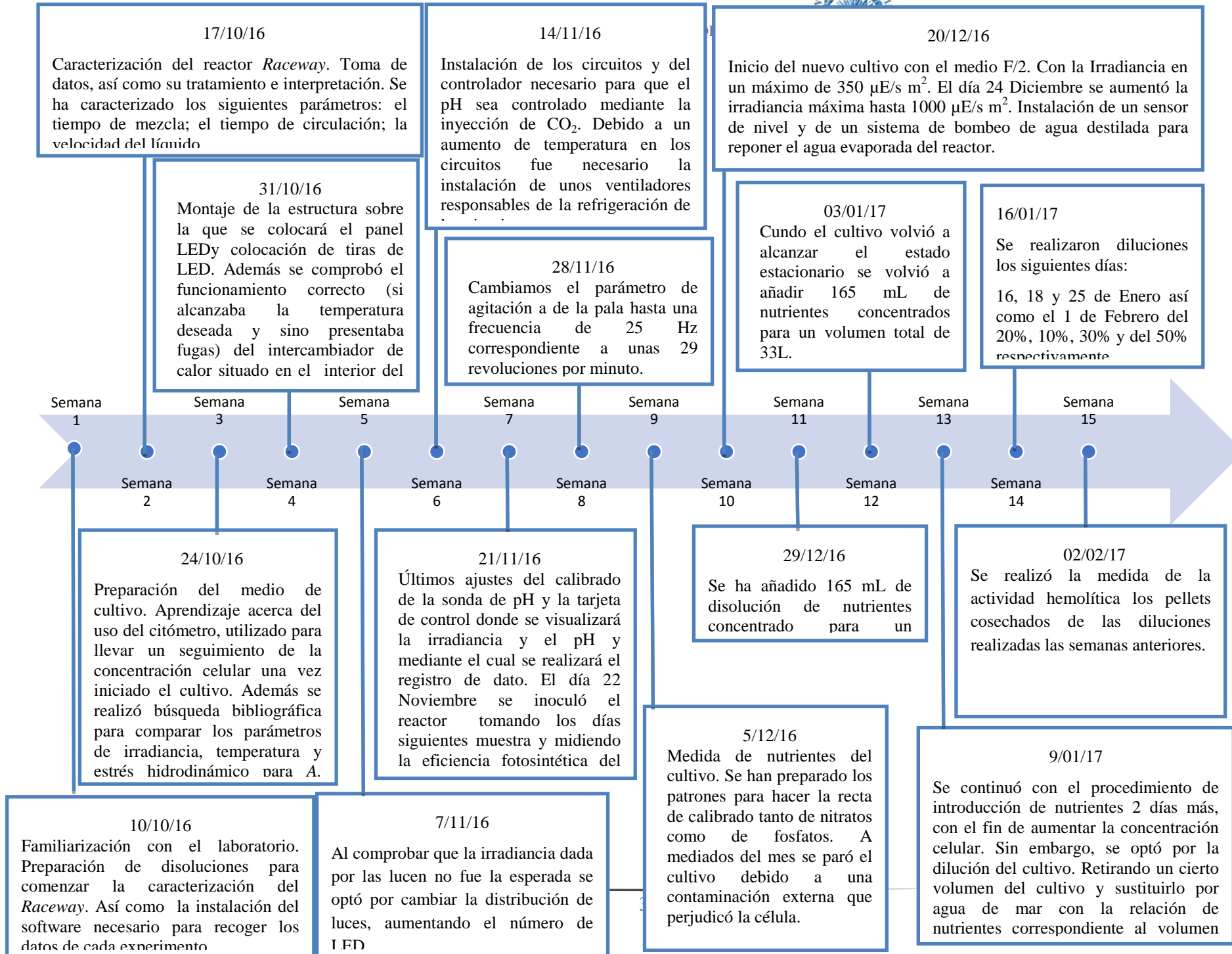
El control del pH se realizó por medio de inyección de CO_2 a demanda. Para la medida/control de pH se usó un pHmetro Hanna. Debido a la evaporación producida en el *FBR* se implementó un sistema de control de nivel integrado por un sensor de nivel óptico y una bomba peristáltica que reponía el nivel del cultivo con agua destilada estéril.

Fase 3: Cultivo de *A. carterae*

Durante el periodo de cultivo se tomó muestra para hacer el seguimiento de la concentración celular y F_v/F_m . Una vez alcanzado el estado estacionario se implementó una estrategia de cultivo tipo “feed-batch”

Se realizó un seguimiento de la capacidad que presentan este tipo de sustancias para lisar los glóbulos rojos (i.e hemolisis) con el objetivo de tener noción del contenido de amphidinolos. Para esta medida se usa el pellet celular.









5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación fluidodinámica

Los ensayos realizados de caracterización fluidodinámica permitieron establecer una relación clara entre la velocidad angular de la pala y los parámetros fluidodinámicos estudiados (tiempo de mezcla y tiempo de circulación). En la figura 12a) se puede apreciar como a valores bajos de velocidad de paleteo (N_ω) los valores de los tiempos de mezcla (t_m) aumentan ostensiblemente, algo lógico puesto que el único elemento que induce mezcla en este dispositivo es la paleta y a velocidades bajas no se produce mezcla alguna. Por otro lado, analizando la figura 12b) en la que se representan los valores medios de t_m medidos en distintas alturas del dispositivo (H) pone de manifiesto una estratificación en la mezcla. Aunando ambos resultados (Fig 12c)) se puede observar como para velocidades bajas de mezclado se produce un aumento de t_m y la estratificación de la mezcla es mucho mayor que a valores altos de N_ω . Este fenómeno de estratificación puede afectar a la productividad celular, ya que valores bajos de N_ω acarrearán falta de homogeneidad en el medio con la consecuente creación de zonas con gradientes nutricionales y lumínicos o acumulación del oxígeno fotosintético [19] que puede acarrear estrés oxidativo. Por otro lado, una mezcla demasiado alta puede ocasionar estrés hidrodinámico en células sensibles como es el caso de los dinoflagelados.

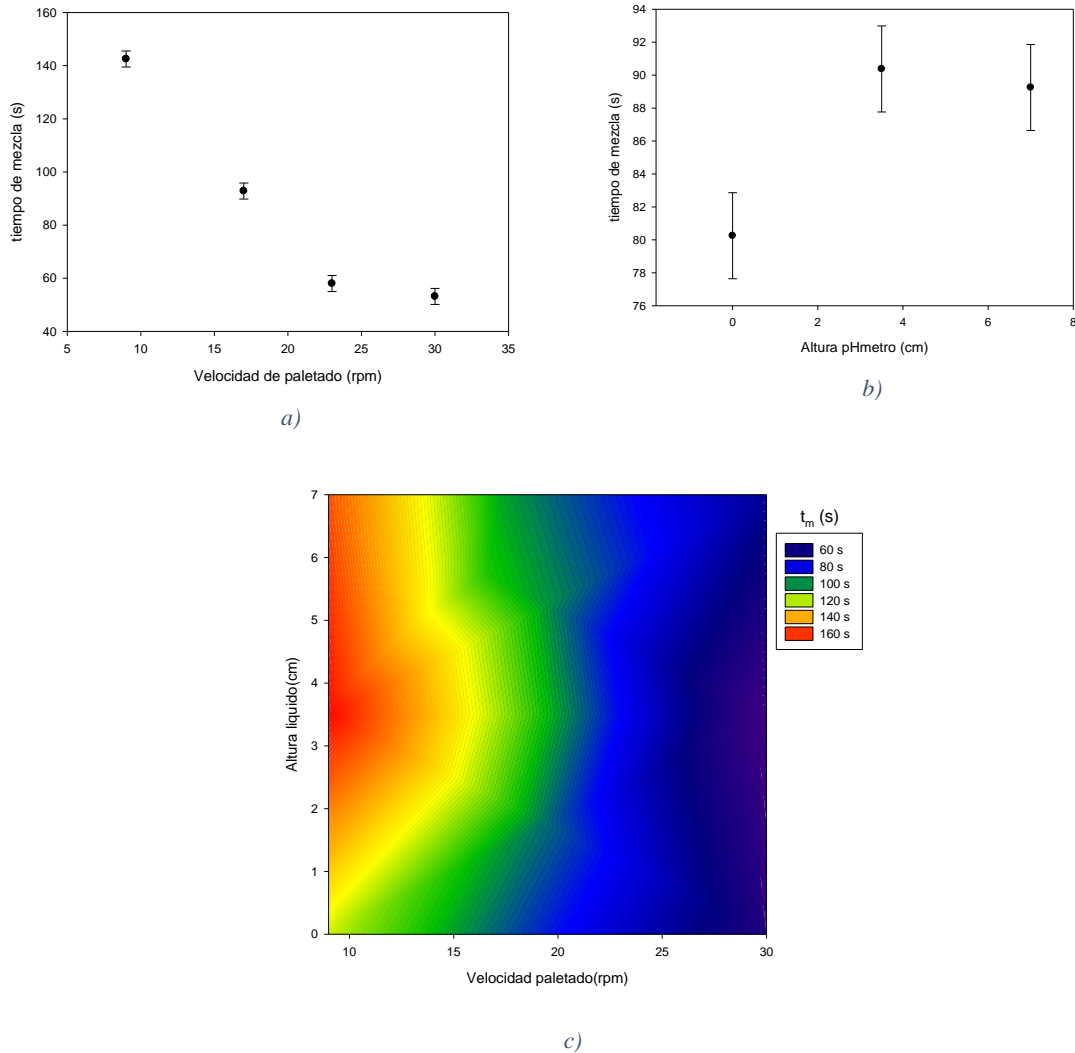


Figura 12. Se muestran los valores medios de los tiempos de mezcla obtenidos por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para las distintas alturas de medida y las dos posiciones de medida.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos por medio de un estudio estadístico de análisis de varianza (ANOVA) que evalúa el efecto de la velocidad angular de la pala (N_ω), la altura de medida del electrodo (H) y la posición de la sonda de pH (pHi) en el tiempo de mezclado. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que a nivel individual la velocidad de agitación de la pala es el efecto que posee la mayor importancia estadísticamente hablando en la variación del tiempo de mezclado. Por otro lado, el efecto combinado de H y N_ω es la única interacción que ejerce un efecto estadísticamente significativo en la velocidad de mezcla.

Tabla 4. Evaluación del tiempo de mezcla en RC-FBR en función de la altura de medida de pH (H), la velocidad de paletado (N) y la posición de medida del pHmetro (pH_i) por medio de un análisis de varianza multifactorial (ANOVA). La variabilidad general se divide en varios componentes: un componente atribuible al efecto principal de cada factor y otro atribuible a la interacción entre diferentes factores. El porcentaje de variación de la respuesta (Variación,%), explicada por la contribución de cada factor e interacción, como el porcentaje de la razón F de cada factor respecto a la suma de todas las relaciones F .

Variable	Estadísticas	Efectos principales			Interacciones		
		H	N_ω	pH_i	$H-N_\omega$	$H-pH_i$	$N_\omega-pH_i$
t_m	Variación	4.52	187.18	6.90	7.21	1.59	0.44
	Valor -p	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

Con los tiempos de circulación obtenidos en los ensayos de estímulo-respuesta se calcularon las velocidades de flujo en los canales del RW-FBR. En la Fig 13 se presentan el ajuste obtenido para los valores medios de velocidad de flujo en los canales del líquido para las distintas velocidades de agitación en las distintas alturas obtenidos por medio de una ANOVA. Se puede observar que las velocidades medias de circulación del líquido presentan una correlación lineal con la velocidad angular del paletado.

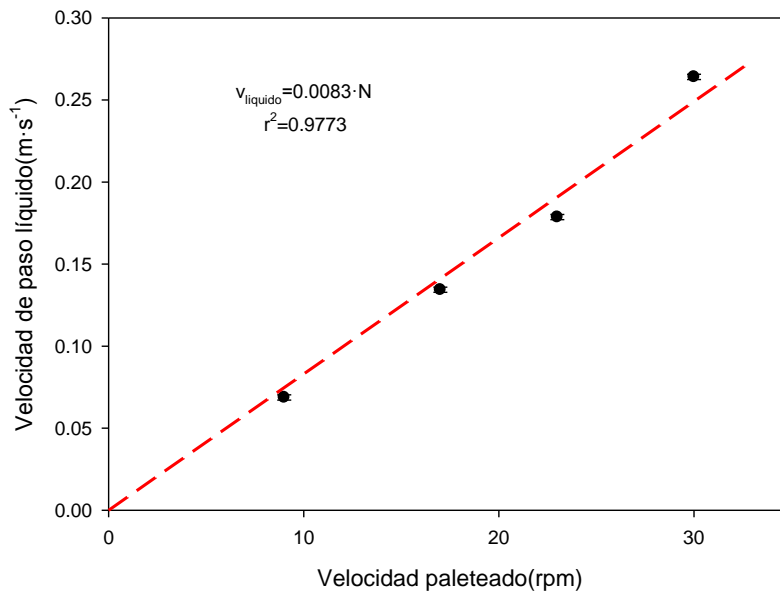


Figura 13. valores medios de velocidad de flujo

Ampliamente es conocido que la potencia de agitación depende directamente de la velocidad de flujo. Velocidades de flujo de $0.05 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ son suficientes para prevenir la estratificación térmica, velocidades superiores a $0.1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ evitan la sedimentación de

células siendo el valor convencional para la producción masiva de microalgas de $0.3\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ [45].

5.2. Cultivo de *Amphidinium carterae*

El alga se cultivó en el *RW-FBR* con iluminación *LED*. En la Fig. 14 se muestra la evolución de la concertación celular para las diversas estrategias de cultivo ensayadas para maximizar la productividad de biomasa. El experimento comenzó con un cultivo en modo discontinuo, en el que con el fin de evitar posibles efectos de fotoinhibición y facilitar la fotoadaptación del cultivo, se fijó el valor máximo de irradiancia que llegaba al fondo del *RW-FBR* en la hora central del ciclo iluminado (I_{0max}) a un valor de $350\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Tras 4 días de cultivo y con una concentración celular de $100000\text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ se aumentó el valor de I_{0max} a $1000\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En las etapas 1-3 de cultivo se obtuvieron los mayores valores de μ_m . Este resultado se justifica debido a que los valores de Y_{av} en estas zonas corresponden a niveles de irradiancia que aseguran que la luz no es un factor limitante en el crecimiento junto a que los nutrientes tampoco ejercen una limitación. Tras 9 días el cultivo entró en fase estacionaria con una concentración celular (N) de $0.5\times 10^6\text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. En este momento se cambió el modo cultivo a “fed batch” en el que se realizaron adiciones de nutrientes en el momento que se detectó una fase estacionaria. La limitación nutricional del fosfato fue confirmada por medio de la medida de los nutrientes tras las distintas adiciones nutricionales. En la figura 14 se muestra un rápido consumo de P mientras que por su parte el N no mostró esta tendencia ya que fue acumulándose en el sobrenadante durante el cultivo. Obviamente, las cantidades de células producidas en cada reposición fueron disminuyendo ya que la disponibilidad de fosfato por célula disminuyó notablemente a medida que N aumentaba con el tiempo de cultivo. La evolución de cultivo describe un patrón de crecimiento fuertemente controlado por la disponibilidad de fosfato en el sobrenadante.

Por otro lado, evaluando la respuesta del aparato fotosintético mediante la medida de F_v/F_m se puede apreciar en la Figura 15 cómo ni en los primeros días ($I_{0max} = 350\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ni en los días posteriores al aumento de irradiancia ($I_{0max} = 1000\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se produjeron efectos de fotoinhibición ya que en ningún caso los valores de F_v/F_m estuvieron por debajo de 0.6. Aunque no hay un consenso global sobre los valores del

F_v/F_m considerados como saludables, es cierto que otros autores [46] consideran valores de alrededor de 0.6 como fotosintéticamente saludables.

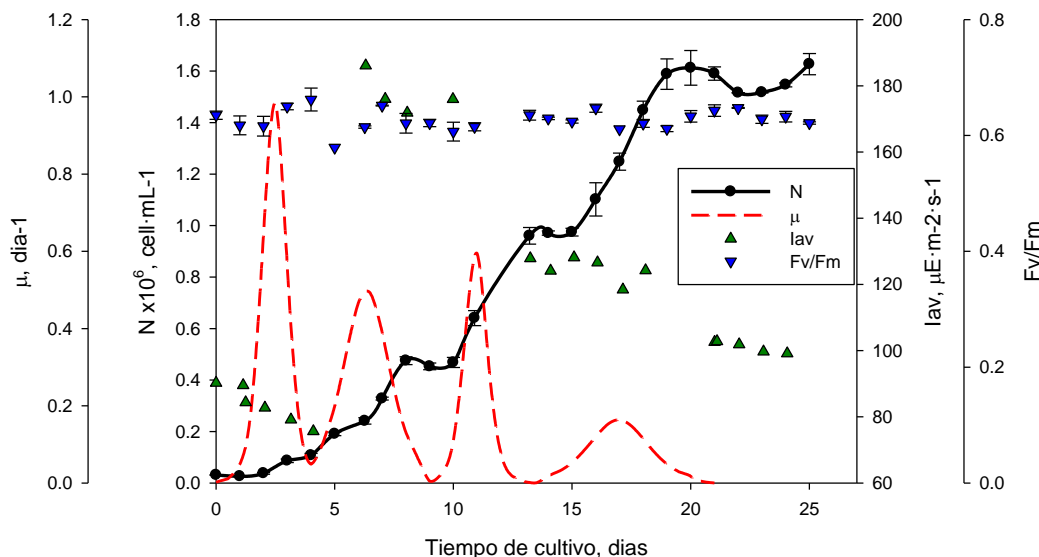


Figura 14. Evolución temporal de la concentración celular (N), irradiancia media diaria (Y_{av}), velocidad específica de crecimiento (μ) y eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m) para las distintas etapas del cultivo. Etapa 1: $I_{omax} = 350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Etapa 2: $I_{omax} = 1000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Etapa 3: $I_{omax} = 1000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y restitución de nutrientes; Etapa 4: $I_{omax} = 1000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y restitución de nutrientes y Etapa 5: $I_{omax} = 1000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y restitución de nutrientes.

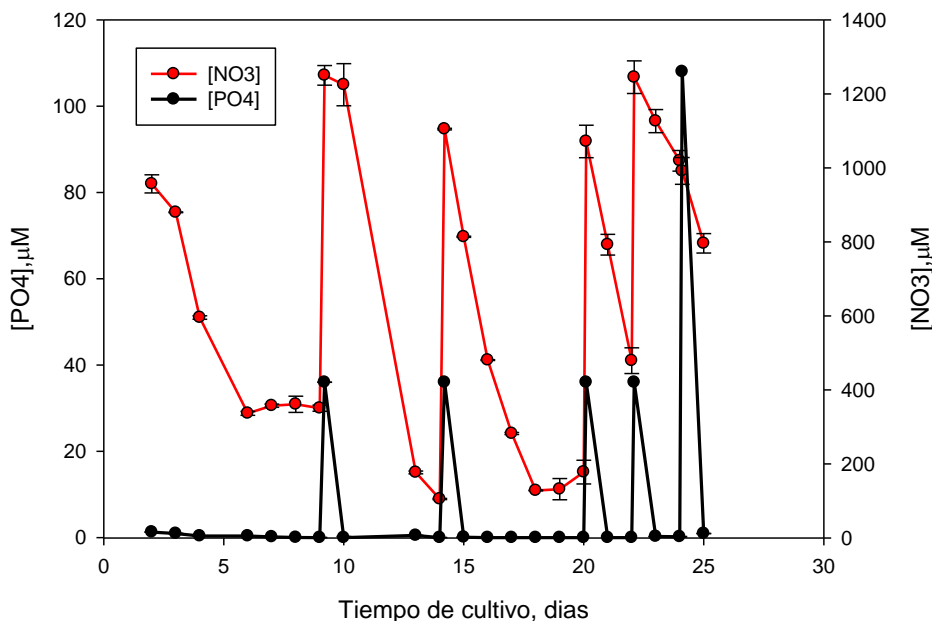


Figura 14. Evolución temporal de los nitratos ($[NO_3^-]$) y fosfatos ($[PO_4^{3-}]$) disueltos en el sobrenadante del cultivo

En la Fig. 16 se muestra la evolución temporal de los valores de EC50. Los valores de EC50 aumentan conforme el cultivo se encuentra en fase de crecimiento y por el contrario disminuyen al producirse fases estacionarias. Teniendo en cuenta que un aumento de EC50 acarrea un descenso de la citotoxicidad se puede ver como la producción de amphidinolos se incrementa en las etapas donde el crecimiento está limitado. Este tipo de comportamiento pone de manifiesto el carácter de metabolito secundario no ligado al crecimiento y suele ser algo característico de los dinoflagelados [47], [48].

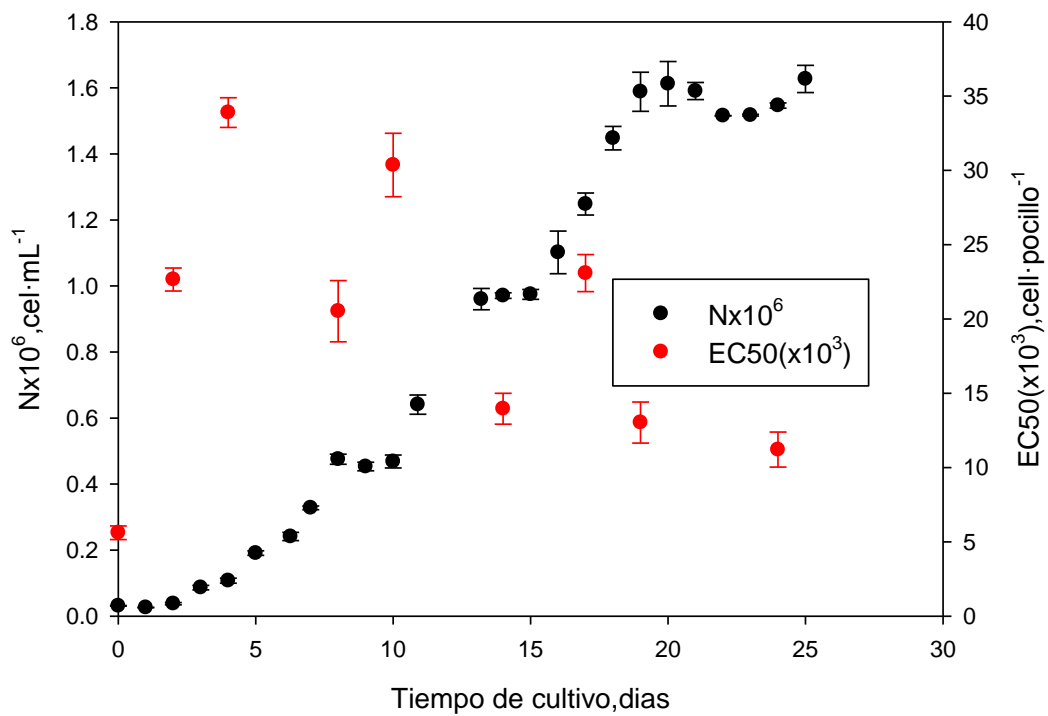


Figura 16. Evolución temporal de los valores de EC50 y concentración celular (N)



6. Conclusiones

Se consiguió satisfactoriamente el cultivo de la microalga dinoflagelada e hidrodinámicamente sensible *Amphidinium carterae* en un *FBR* tipo *Raceway* iluminada con un sistema de luces *LED* multicolor capaz de imitar la luz solar. Los perfiles de irradiancia locales fueron modelados con precisión. Las cinéticas de crecimiento dependían de la irradiancia media, así como de los parámetros fluidodinámicos de tiempo de mezcla y estrés hidrodinámico.



7. Bibliografía

- [1] A. Moestrup, Ø.; Akselmann, R.; Fraga, S.; Hansen, G.; Hoppenrath, M.; Iwataki, M.; Komárek, J.; Larsen, J.; Lundholm, N.; Zingone, “IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.” 2009.
- [2] B. F. Bowden, “YESSOTOXINS—POLYCYCLIC ETHERS FROM DINOFLAGELLATES: RELATIONSHIPS TO DIARRHETIC SHELLFISH TOXINS,” *Toxin Rev.*, vol. 25, no. 2, pp. 137–157, 2006.
- [3] C. Enzing, M. Ploeg, M. Barbosa, and L. Sijtsma, *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe*. 2014.
- [4] A. Sukenik, O. Zmora, and Y. Carmeli, “Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp.,” *Aquaculture*, vol. 117, no. 3–4, pp. 313–326, 1993.
- [5] E. Molina, J. Fernández, F. G. Acién, and Y. Chisti, “Tubular photobioreactor design for algal cultures,” *J. Biotechnol.*, vol. 92, no. 2, pp. 113–131, 2001.
- [6] E. Sierra, F. G. Acién, J. M. Fernández, J. L. García, C. González, and E. Molina, “Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae,” *Chem. Eng. J.*, vol. 138, no. 1–3, pp. 136–147, May 2008.
- [7] W. C. Dunlap *et al.*, “Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach,” *Methods*, vol. 42, no. 4, pp. 358–376, Aug. 2007.
- [8] F. G. Camacho *et al.*, “Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 2, pp. 176–194, 2007.
- [9] M. Demura, M.-H. Noël, F. Kasai, M. M. Watanabe, and M. Kawachi, “Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity,” *Phycologia*, vol. 48, no. 6, pp. 518–535, Nov. 2009.
- [10] D. Chaumont, “Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, pp. 593–604, 1993.
- [11] C. Contreras-Flores, J. M. Peña-Castro, L. B. Flores-Cotera, and R. O. Cañizares-Villanueva, “Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas,” *Inverciencia*, vol. 28, no. 8, pp. 450–456, 2003.



- [12] G. Johnsen and E. Sakshaug, "Light Harvesting in bloom-forming marine phytoplankton: Species-specificity and photoacclimation," *Sci. Mar.*, vol. 60, no. SUPPL. 1, pp. 47–56, 1996.
- [13] J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, and M. R. Prinsep, "Marine natural products.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 26, no. 2, pp. 170–244, Feb. 2009.
- [14] P. J. Scheuer, *Drugs from the Sea*, no. 14. 1991.
- [15] F. G. Ación Fernández, J. M. Fernández Sevilla, J. A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, and Y. Chisti, "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 56, no. 8, pp. 2721–2732, 2001.
- [16] J. M. Fernández-Sevilla, F. G. Ación Fernández, and E. Molina Grima, "Biotechnological production of lutein and its applications.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 1, pp. 27–40, Mar. 2010.
- [17] J. J. Gallardo-Rodríguez, A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, M. C. Cerón-García, E. H. Belarbi, and E. Molina-Grima, "Culture of dinoflagellates in a fed-batch and continuous stirred-tank photobioreactors: Growth, oxidative stress and toxin production," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 5, pp. 660–666, May 2010.
- [18] H. Hu, Y. Shi, and W. Cong, "Improvement in growth and toxin production of *Alexandrium tamarense* by two-step culture method," *J. Appl. Phycol.*, vol. 18, no. 2, pp. 119–126, 2006.
- [19] J. L. Mendoza *et al.*, "Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production," *Biomass and Bioenergy*, vol. 54, pp. 267–275, 2013.
- [20] M. Ecology, "Effect of Light Intensity on Macromolecular Synthesis in Cyanobacteria Author (s): Allan Konopka and Marilyn Schnur Published by : Springer Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4250630> Effect of Light Intensity on Macromolecular Synthesis," vol. 6, no. 4, pp. 291–301, 2017.
- [21] A. M. Tatsuru Masuda, Ayumi Tanaka and C. 94720-3102 Department of Plant and Microbial Biology, 111 Koshland Hall, University of California, Berkeley, "Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression," *CEUR Workshop Proc.*, vol. 1225, no. May, pp. 41–42, 2014.



- [22] M. Glemser *et al.*, “Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1077–1088, 2016.
- [23] A. Jacobi, C. Steinweg, R. R. Sastre, and C. Posten, “Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics,” *Eng. Life Sci.*, vol. 12, no. 6, pp. 621–630, Nov. 2012.
- [24] S. Muthu, F. J. Schuurmans, and M. D. Pashley, “Red, green, and blue LED based white light generation: issues and control,” *Conf. Rec. 2002 IEEE Ind. Appl. Conf. 37th IAS Annu. Meet. (Cat. No.02CH37344)*, vol. 1, pp. 327–333, 2002.
- [25] K. A. Radzun *et al.*, “Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, p. 65, 2015.
- [26] P. S. C. Schulze, L. A. Barreira, H. G. C. Pereira, J. A. Perales, and J. C. S. Varela, “Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production,” *Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 422–430, 2014.
- [27] H. C. P. Matthijs, H. Balke, U. M. Van Hes, B. M. A. Kroon, L. R. Mur, and R. A. Binot, “Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*),” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 50, no. 1, pp. 98–107, 1996.
- [28] M. Chen, T. Mertiri, T. Holland, and A. S. Basu, “Optical microplates for high-throughput screening of photosynthesis in lipid-producing algae,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 20, p. 3870, 2012.
- [29] L. Nedbal, M. Trtílek, and D. Kaftan, “Flash fluorescence induction: A novel method to study regulation of Photosystem II,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 154–157, 1999.
- [30] M. Nymark *et al.*, “Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [31] A. Christoph Apel and D. Weuster-Botz, “Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 995–1008, 2015.



- [32] W. Hu, J. Xu, J. Sinkkonen, and J. Wu, "Polyketides from Marine Dinoflagellates of the Genus *Prorocentrum*, Biosynthetic Origin and Bioactivity of Their Okadaic Acid Analogues," *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 10, no. 1, pp. 51–61, 2010.
- [33] M. Hultberg, H. L. Jönsson, K. J. Bergstrand, and A. S. Carlsson, "Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*," *Bioresour. Technol.*, vol. 159, pp. 465–467, 2014.
- [34] B. F. Lucker, C. C. Hall, R. Zegarac, and D. M. Kramer, "The environmental photobioreactor (ePBR): An algal culturing platform for simulating dynamic natural environments," *Algal Res.*, vol. 6, no. PB, pp. 242–249, 2014.
- [35] I. Nishida and N. Murata, "Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids.," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, no. August 2015, pp. 541–568, 1996.
- [36] C. & Graham P, Harris and Hall, "Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation," vol. 2, no. 12, p. 48109, 1986.
- [37] G. Rhee and I. Gothan, "The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation.," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 26, no. 4, pp. 635–648, 1981.
- [38] R. Zeebe and D. Wolf-Gladrow, "CO₂ in Seawater-Equilibrium, Kinetics, Isotopes," *Elsevier*, p. 100, 2001.
- [39] A. P. Carvalho, L. A. Meireles, and F. X. Malcata, "Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances," *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 6, pp. 1490–1506, 2006.
- [40] T. Sato, D. Yamada, and S. Hirabayashi, "Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect," *Energy Convers. Manag.*, vol. 51, no. 6, pp. 1196–1201, 2010.
- [41] J. J. Gallardo Rodríguez, "Ingeniería de bioprocesos en el cultivo de dinoflagelados."
- [42] P. Verlaan, A. M. M. Van Eijs, J. Tramper, K. V. t Riet, and K. C. A. M. Luyben, "Estimation of axial dispersion in individual sections of an airlift-loop reactor," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 44, no. 5, pp. 1139–1146, 1989.
- [43] T. Method, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," *Public Health*, no. 1, pp. 1–7,



1999.

- [44] I. Niizawa, J. M. Heinrich, and H. A. Irazoqui, “Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 90, no. September 2014, pp. 214–223, 2014.
- [45] S. Tahir, “Raceway-based production of microalgae for possible use in making biodiesel,” 2014.
- [46] F. García-Camacho, A. Sánchez-Mirón, J. Gallardo-Rodríguez, L. López-Rosales, Y. Chisti, and E. Molina-Grima, “Culture of Microalgal dinoflagellates,” in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Third Edition*, L. M. Botana, Ed. 2014, p. 1215.
- [47] L. López-Rosales *et al.*, “Simultaneous Effect of Temperature and Irradiance on Growth and Okadaic Acid Production from the Marine Dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*,” *Toxins*, vol. 6, no. 1. 2014.
- [48] A. R. Place, H. A. Bowers, T. R. Bachvaroff, J. E. Adolf, J. R. Deeds, and J. Sheng, “*Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite,” *Harmful Algae*, vol. 14, pp. 179–195, Feb. 2012.



AGRADECIMIENTOS

A las primeras personas que quiero agradecer es a mi tutor Francisco García Camacho y mi cotutor Lorenzo López Rosales que sin su ayuda y conocimientos no hubiese sido posible realizar este proyecto.

A mis padres, por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. A mis compañeros de clase, que se más que compañeros ya son amigos. Gracias por compartir grandes momentos y estar siempre a mi lado. En especial quería agradecer a Jorge Molina Rodríguez que estaba ahí en los momentos de agobio y por animarme siempre que lo necesitaba.