



*FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS*

**“Efectos de un campo magnético estático
de 47,23 mT en cultivos de *Chlorella
vulgaris* Beijerinck”**

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología
Industrial**

**Autora: Lic. Yadira Silveira Font
Tutora: Dra. C. Liliana Gómez Luna**

Año 2017

Pensamiento

PENSAMIENTO

“Pregúntate si lo que estás haciendo hoy te acerca al lugar en el que quieres estar mañana”.

Walt Disney.

Dedicatoria

DEDICATORIA

*A la Virgen de la Caridad del Cobre y San Judas Tadeo, porque aunque seamos
mujeres y hombres de ciencia, no debemos perder la fe.*

A mis padres por el apoyo incondicional.

A mis abuelos Alejandro (Tatin), Mercedes, Jorge y Sara.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Se agradece de forma especial al colectivo del CNEA por su contribución al logro de esta investigación; al Consejo Científico Institucional, que validó la misma; al colectivo de profesores de la Maestría Biotecnología del CEBI por todos los conocimientos aportados y al Proyecto 1 del Macroproyecto VLIR-IUC-UOS, gracias al cual se desarrolló esta investigación.

Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a mi tutora Dra. C. Lily, por la oportunidad que me dio al mostrarme el hermoso mundo de las microalgas. Gracias por la confianza depositada en mí, tu tiempo, tu visión científica y todo lo que me has enseñado, tanto dentro como fuera del ámbito laboral.

A Melek, porque mis primeros pasos en la investigación los di a tu lado, gracias por todo lo que me has enseñado y todo el cariño que me has dado, muchas gracias por dejarme volar...

A mi media naranja científica (Ramoncítín), porque la vida no vale la pena sin buenos amigos con los que compartir las cosas buenas y malas, gracias por estar siempre ahí, y por asegurarte de que todavía no me haya matado un carro.

Agradezco enormemente a mi tío Camué, por presentarme las partes del microscopio e incentivarme siempre a luchar y esforzarme por mi superación; muchas gracias por la revisión de la tesis!!! A la profesora Amanda Moya, por enseñarme a contar células, todo comenzó ahí...

A Yadenis (Yade), por toda la preocupación, y la ayuda para que estos experimentos salieran bien.

A mi chuchi, María Ángeles, por tus buenos consejos, por todo el cariño y la disposición de ayudarme siempre que te he necesitado. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado.

A las estudiantes Dianelys, Casimira y Marilia, porque fue bueno comenzar esta aventura a su lado.

A mis compañeros de la Maestría, es imposible olvidarse de todos los buenos momentos que pasamos juntos, la camaradería y la ayuda incondicional ante las necesidades del otro.

Parte importante de este trabajo no se hubiese realizado sin la ayuda de los compañeros de producción: a Tony, Pascual, Ángel, Robertico, Alvita, Miriam, Fidelito, Castillo, Joaquín e Iván; gracias por atender con urgencia los problemas tecnológicos de la instalación experimental.

A “Elpidio” y a Guille, por toda la ayuda incondicional, en cualquier horario.

A Sianna por las consultas académicas.

A las muchachitas, Yilan y Albys, por la buena compañía durante las jornadas de trabajo en las vacaciones. A Eliza muchas gracias, por las revisiones y por siempre tener la disposición de ayudar.

A Vivian muchísimas gracias por la ayuda en la revisión de esta tesis, por los aportes realizados en función de una mejor comprensión del documento escrito.

A Lorenzitooooooooo, gracias por todas las horas extras.

A Javier, Oraima, Dago, Zayli y Neldrys, muchísimas gracias, por hacernos sentir a todos como si estuviéramos en nuestras casas, y por toda la paciencia y el cariño.

A las muchachitas de Economía: Lisy, Leynet, Lisandra, Wilbia y Norma, porque siempre es bueno tener donde y con quien relajarse, gracias.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas: Isabelita, Osmaida y Daniel, por tener la disposición siempre de cubrirme las clases, cuando debía recibir los cursos de la Maestría, muchas gracias.

A mis amigos de toda la vida, Katy, Dayana, Maritere, la May y Diane, porque sé que mis logros son también sus logros.

Y no por último menos importante, agradezco infinitamente a mi familia, por ser el motor impulsor de todas las cosas en mi vida. A mis tías: Malú (mi loquita), Ceci, y Lucía, por ser las grandes mujeres que son, y mostrarme que puedo llegar a donde quiera, solo está en proponérselo. A mi tío Rubén, por toda la preocupación en todo momento.

A mi abuela Sara, por siempre impulsarme a seguir adelante, a no claudicar.

A mi hermano Javier y mi sobrina Amanda, porque siempre he querido ser un buen ejemplo para ellos.

A mis loquitos, mi mamá y mi papá, porque de no tener la familia que tengo, no hubiera podido alcanzar nada de lo que he logrado.

A todos,

MUCHAS GRACIAS.

Resumen

RESUMEN

Entre las microalgas de mayor importancia por su valor económico y nutricional se encuentra *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Sin embargo, existen limitaciones para su producción a gran escala y la estandarización de cultivos. En este trabajo se evalúa el efecto de un campo magnético estático no homogéneo de 47,23 mT aplicado en diferentes momentos de la fase exponencial sobre la cinética de crecimiento, viabilidad, concentración de oxígeno disuelto, tasa de evolución de oxígeno fotosintético, tasa de producción de oxígeno y productividad de cultivos de *C. vulgaris* a escala de laboratorio. Los mayores valores de concentración celular ($26\,214,75 \pm 4,0 \times 10^4$ cél. mL⁻¹) y mejores parámetros de viabilidad, se obtuvieron durante la fase exponencial temprana con la aplicación de tres dosis repetidas con campo magnético estático. Se estimuló, además, la producción de oxígeno disuelto y fotosintético, obteniéndose valores significativamente superiores a los alcanzados durante la fase exponencial tardía. Se incrementó la concentración de pigmentos fotosintéticos en todos los cultivos tratados con campo magnético, independientemente de la dosis y de la fase del crecimiento donde se aplica, siendo mayores los valores obtenidos durante la fase exponencial temprana. La productividad de biomasa aumentó significativamente respecto a los cultivos controles cuando se aplicó el campo magnético durante las fases del crecimiento exponencial. Se propone la utilización del esquema de exposición durante la fase exponencial temprana, ya que en esta fase del crecimiento, el metabolismo del microorganismo es más eficiente bajo la acción de este agente físico externo.

Palabras clave: campo magnético, *Chlorella vulgaris*, pigmentos fotosintéticos, viabilidad, oxígeno disuelto, productividad.

Abstract

ABSTRACT

Among the microalgae of greatest importance for its economic and nutritional value is *Chlorella vulgaris* Beijerinck. However, there are limitations to its large-scale production and crop standardization. In this work, the effect of a 47,23 mT inhomogeneous static magnetic field applied at different moments of the exponential phase on the kinetics of growth, viability, dissolved oxygen concentration, photosynthetic oxygen evolution rate, oxygen production rate and crop productivity of *C. vulgaris* at laboratory scale are evaluated. The highest cell concentration values ($26\,214,75 \pm 4,0 \times 10^4$ cells mL⁻¹) and better viability parameters were obtained during the early exponential phase with the application of three repeated doses with a static magnetic field. The production of dissolved and photosynthetic oxygen was also stimulated, obtaining significantly superior values than those reached during the late exponential phase. The concentration of photosynthetic pigments was increased in all the crops treated with magnetic field, independently of the dose and the phase of growth where it is applied, being higher the obtained values during the early exponential phase. The biomass productivity increased significantly with respect to the control crops when the magnetic field was applied during the phases of exponential growth. The use of the exposure scheme during the early exponential phase is proposed, because in this phase of growth the metabolism of the microorganism is more efficient under the action of this external physical agent.

Keywords: magnetic field, *Chlorella vulgaris*, photosynthetic pigments, viability, dissolved oxygen, productivity.

Índice

Índice	Pág.
Introducción	1
Capítulo 1. Revisión bibliográfica	5
1.1 Las microalgas	5
1.2 Curva de crecimiento de las microalgas	6
1.2 Principales factores de crecimiento de las microalgas	8
1.2.1 Intensidad de la luz	8
1.2.2 Temperatura.....	9
1.2.3 pH	10
1.2.4 Nutrientes	11
1.2.5 Carbono	12
1.3 Biotecnología de microalgas: aplicaciones industriales	12
1.3.1 Usos en la industria alimentaria.....	13
1.3.2 Usos en la agricultura	14
1.3.3 Usos en la industria farmacéutica.....	14
1.3.4 Las microalgas en la Biotecnología ambiental: potencial para la biorremediación	15
1.3.5 Las microalgas como fuente de biocombustibles	15
1.4 Sistemas de producción	17
1.5 Experiencias acumuladas sobre el efecto de CME en cultivos de microalgas	18
Capítulo 2. Materiales y métodos	20
2.1 Descripción de la especie: <i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	20
2.2 Condiciones experimentales para el cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck	21
2.2.1 Pre-inóculos e inóculos.....	21
2.2.2 Medio de cultivo.....	21
2.2.3 Condiciones generales de la instalación	22
2.2.3.1 Interferencia electromagnética	22
2.2.3.2 Temperatura e iluminación	22
2.2.3.3 Aireación de los cultivos	22
2.2.3.4 pH	23
2.3 Descripción de los experimentos	23
2.3.1 Establecimiento de cultivos densos	23

2.3.2 Metodología para el desarrollo de los experimentos	23
2.3.2.1 Exposición de los cultivos a un Campo Magnético Estático.....	23
2.3.2.2 Descripción del arreglo de imanes.....	24
2.4 Determinaciones sobre células en cultivo	24
2.4.1 Determinación del número total de células	24
2.4.2 Determinación de la viabilidad.....	25
2.4.2.1 Determinación de la tasa de crecimiento media y el tiempo de duplicación.....	25
2.4.3 Determinación espectrofotométrica de pigmentos	25
2.4.4 Determinación de oxígeno disuelto	26
2.4.4.1 Determinación de la tasa de evolución de oxígeno fotosintético	26
2.4.4.2 Determinación de la tasa de producción de oxígeno	27
2.4.5 Observaciones al microscopio óptico	27
2.4.6 Determinación de la materia seca.....	27
2.5 Análisis Estadístico y procesamiento de los datos	28
Capítulo 3. Resultados y Discusión	29
3.1 Cinética de crecimiento de cultivos controles de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck	29
3.2 Cinética de crecimiento de cultivos de <i>C. vulgaris</i> expuestos al CME	30
3.3 Viabilidad de cultivos <i>C. vulgaris</i> Beijerinck expuestos a un CME en diferentes momentos del crecimiento	32
3.3.1 Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación	32
3.4 Efecto del CME sobre la concentración de oxígeno disuelto en cultivos densos de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck	33
3.4.2 Tasa de evolución de Oxígeno fotosintético de cultivos de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck expuestos a un CME en diferentes fases del crecimiento.....	36
3.4.3 Tasa de producción de Oxígeno de cultivos de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck expuestos a un CME en diferentes fases del crecimiento	37
3.5 Efecto del CME sobre la concentración pigmentos fotosintéticos en cultivos densos de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck	38
Concentración y productividad de biomasa de cultivos densos de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck expuestos al CME	40

3.7 Consideraciones generales de los efectos del CME en cultivos densos de una cepa local de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck	42
Conclusiones.....	45
Recomendaciones.....	46
Referencias Bibliográficas	47
Anexo 1 Diagrama de la lógica de investigación.....	59
Anexo 2 Instalación experimental para cultivos aireados de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck.....	60
Anexo 3 Arreglo de imanes.....	61
Anexo 4 Cultivo denso de <i>C. vulgaris</i> Beijerinck.....	62

Introducción

INTRODUCCIÓN

Las microalgas han generado un especial interés para la Biotecnología gracias a su capacidad para acumular biomoléculas de alto valor de uso para diferentes industrias como: farmacéutica, alimentaria, cosmética y, recientemente, en el ámbito de los recursos energéticos alternativos procedentes de fuentes biológicas vegetales.

El interés por estos microorganismos, que comenzó durante la segunda guerra mundial, está muy vinculado a su composición bioquímica (Borowitzka, 2013; Yaakob y cols., 2014), a su facilidad para crecer de forma intensiva. Estos pueden utilizar CO₂ como fuente de carbono (Pires y cols., 2014), y la radiación solar como fuente de energía, con extraordinarios ahorros de superficie de cultivo, si se compara con la superficie media que demanda la producción de cultivos agrícolas convencionales (Moreno-Garcia y cols., 2017).

Una de las características más importantes de las microalgas, como organismos fotosintetizadores, es su ubicuidad. Estas se encuentran presentes en la mayoría de los ambientes, incluso en los más extremos. Esta cualidad permite su amplia distribución en la biosfera y su adaptación a una gran variedad de hábitats (Borowitzka, 2013). También este rasgo pudiera explicar el rendimiento tan alto de biomasa en estos microorganismos. Por estas razones las microalgas constituyen uno de los principales componentes de la productividad primaria en los ecosistemas acuáticos, considerándose una opción prometedora para aplicaciones biotecnológicas (Yaakob y cols., 2014). Esta adaptabilidad es resultado de una combinación de numerosos factores, tales como: cambios rápidos en la configuración y actividad del aparato captador de luz (Pires y cols., 2014), altas tasas de crecimiento y una elevada eficiencia fotosintética (Benavente-Valdés y cols., 2016).

Bajo condiciones de cultivo desfavorables, algunas especies de microalgas presentan variaciones significativas en la composición celular. *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii* y *Dunaliella salina* muestran en condiciones medioambientales favorables, entre un 30 % y 50 % de su peso en proteínas, de un 20 % a un 40 % en carbohidratos, y de un 8 % a un 15 % en lípidos. Sin embargo, en presencia de condiciones desfavorables, pueden llegar a acumular hasta un 80 % de su peso seco en compuestos hidrocarbonados (Hu, 2004).

Actualmente son muchos los esfuerzos que se dedican para abaratar la producción de estos organismos a gran escala. Estos van desde el establecimiento de inóculos hasta la obtención de metabolitos de interés. Para ello existen especificidades en cuanto al manejo de los cultivos en dependencia del destino de la biomasa. La mayoría de estos métodos se basan en el control y/o variación de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de determinados nutrientes (Arias Peñaranda, 2013; Tadeo-Sánchez y cols., 2014), la variación de la intensidad de la luz, la temperatura y el pH (Borowitzka, 2013).

Aunque estos métodos de cultivo se aplican a nivel industrial, todavía existen necesidades asociadas a problemáticas clave como la obtención de grandes volúmenes de biomasa con mínimos costos de producción, y en general, con la menor utilización de recursos. Es por ello que se investigan nuevos métodos alternativos para la mejora del rendimiento de estos microorganismos, desde la escala de laboratorio hasta el nivel comercial. Uno de estos métodos es la aplicación del campo magnético estático (CME).

Varios trabajos demuestran los beneficios del CME sobre la productividad de metabolitos secundarios, crecimiento y estado de los cultivos de especies de microalgas, entre las que destacan *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* (Luna y cols., 2011; Tu y cols., 2015; Deamici y cols., 2016; Nezammahalleh y cols., 2016). Sin embargo, aún es limitado el conocimiento científico sobre el efecto del campo magnético en especies de microalgas, su interacción con parámetros que definen el crecimiento y la viabilidad de cultivos a diferentes escalas, así como el ensayo de otras dosis y protocolos de aplicación.

CONFIGURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

PROBLEMA CIENTÍFICO

Insuficientes evidencias del efecto del CME aplicado en dosis a repetición, durante la fase exponencial, sobre cultivos mixotróficos de una cepa local de *Chlorella vulgaris* Beijerinck.

OBJETO

Cultivos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck a escala de laboratorio.

CAMPO

Efecto de diferentes dosis de aplicación de un CME, no homogéneo de 47,23 mT, sobre los parámetros de crecimiento celular y viabilidad, la concentración de oxígeno disuelto y de pigmentos fotosintéticos, así como la productividad de los cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck a escala de laboratorio, durante la fase exponencial.

HIPÓTESIS

El efecto de un CME no homogéneo de 47,23 mT aplicado en diferentes dosis en cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck, durante la fase exponencial, pudiera modificar los parámetros de crecimiento celular y viabilidad, la concentración de oxígeno disuelto y de pigmentos fotosintéticos, así como la productividad de los cultivos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes esquemas de aplicación con dosis a repetición de un CME no homogéneo de 47,23 mT, sobre el crecimiento celular y viabilidad, la concentración de oxígeno disuelto y de pigmentos fotosintéticos; así como, la productividad de los cultivos de una cepa local de *C. vulgaris* Beijerinck, durante la fase exponencial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el efecto de tres dosis de aplicación de un CME de 47,23 mT en diferentes momentos de la fase exponencial, sobre la concentración celular máxima, la viabilidad celular y la cinética de los cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck.
2. Comparar el efecto de tres dosis de aplicación de un CME de 47,23 mT en diferentes momentos de la fase exponencial, sobre la concentración de oxígeno disuelto, tasa de evolución de oxígeno fotosintético y la tasa de producción de oxígeno en cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck.

3. Comparar el efecto de tres dosis de aplicación de un CME de 47,23 mT en diferentes momentos de la fase exponencial, sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) en cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck.
4. Proponer el esquema más eficiente de aplicación del CME para incrementar la productividad de la biomasa de *C. vulgaris* Beijerinck con diferentes fines.

IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Se determina el efecto de la aplicación de un CME no homogéneo de 47,23 mT, en dosis a repetición en diferentes momentos de la fase exponencial, sobre el crecimiento, viabilidad concentración de oxígeno disuelto y composición de pigmentos fotosintéticos, de una cepa local de *C. vulgaris* Beijerinck, contribuyendo a fundamentar el uso de esta tecnología limpia en cultivos a escala de laboratorio con potencialidades para el escalado y su posterior utilización en la industria química y farmacéutica.

APORTE TEÓRICO

Contribuye al estudio de la especie, al manejo de parámetros de cultivo de *C. vulgaris* Beijerinck, así como al incremento del conocimiento del efecto de un CME no homogéneo de 47,23 mT en dosis a repetición, determinando el mejor esquema de aplicación.

SIGNIFICACIÓN PRÁCTICA

Contribuye al mejor manejo de cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck con potencialidades de aplicación industrial, con la introducción de la tecnología del CME.

NOVEDAD

Se evalúa el efecto de la aplicación de un CME no homogéneo a 47,23 mT con dosis a repetición y se propone un esquema que permite incrementar la productividad de biomasa de *C. vulgaris* Beijerinck a escala de laboratorio, con potencialidades para el cultivo a mayor escala, no existiendo precedente en la literatura de la respuesta de estos microorganismos ante la exposición a dosis repetidas durante la fase de crecimiento exponencial.

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 LAS MICROALGAS

En Ficología aplicada y Biotecnología, el término microalga define a organismos microscópicos, con clorofila *a*, que realizan fotosíntesis oxigénica. Estos incluyen tanto a microorganismos eucariotas (clasificados tradicionalmente según sus pigmentos fotosintéticos en: rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas) como a procariotas (cianobacterias y proclorofitas) distribuidos por todos los hábitats terrestres y acuáticos (Abalde y cols., 1995).

Las microalgas tienen la capacidad para crecer de manera autotrófica, heterotrófica o mixotrófica, siendo reconocidas como las responsables de al menos la mitad de la productividad primaria del planeta (Hernández-Pérez y cols., 2014). De acuerdo con la clasificación sistemática, las algas pueden agruparse en nueve divisiones, siendo las más importantes: Chlorophyceae (algas verdes), Phaeophyceae (algas pardas), Pyrrophyceae (dinoflagelados), Rhodophyceae (algas rojas) y Chrysophyceae (algas verde-amarillas) (Van den Hoek y cols., 1995).

Las microalgas eucariotas son unicelulares y presentan gran variedad de formas y tamaños; así como de organización intracelular (Abalde y cols., 1995). Contienen las estructuras y orgánulos característicos de una célula eucariota y algunas de ellas presentan orgánulos característicos: el pirenoide y la mancha ocular. El pirenoide, de naturaleza proteica, está asociado al cloroplasto; y la mancha ocular, compuesta por glóbulos lipídicos, se presenta en muchas microalgas flageladas. Las microalgas procariotas tienen una organización más simple que las eucariotas. Pueden presentarse individualmente pero es más frecuente que estén asociadas en estructuras filamentosas (Abalde y cols., 1995).

El aparato fotosintético de las microalgas, al igual que ocurre en plantas superiores, se organiza en orgánulos especiales llamados cloroplastos, estos son los encargados de realizar la fotosíntesis (Gouveia y cols., 2014). Se componen de un sistema de membranas de naturaleza lipoproteica constituidas por tilacoides, una fase acuosa o estroma y diferentes pigmentos accesorios captadores de luz. Las reacciones luminosas fotosintéticas se encuentran en las membranas de los tilacoides

donde existen una serie de pigmentos tales como clorofila *a*, clorofila *b* y xantofilas (carotenoides oxigenados) (Benavente-Valdés y cols., 2016).

Durante la fotosíntesis oxigénica, la luz del sol se convierte en energía química. En este proceso el agua actúa como donador de electrones, generando el poder reductor el trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés), que servirán para diferentes propósitos metabólicos, uno de los más relevantes, la fijación de CO₂ (Tamburic y cols., 2014).

Los compuestos reducidos de carbono, se utilizan como estructura básica para la incorporación de elementos primordiales como nitrógeno, fósforo y azufre. Estos elementos generan monómeros orgánicos simples como: aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros que se ensamblan para formar estructuras más complejas, las cuales constituyen la biomasa de cualquier organismo vivo (Deswarte, 2015).

En general las microalgas pueden considerarse organismos modelo para el estudio de complejos procesos biológicos como: la morfogénesis y diferenciación; el reconocimiento celular; los ritmos biológicos; la evolución de procesos y rutas metabólicas; y la fisiología y bioquímica de la fotosíntesis (Deswarte, 2015; Moreno-Garcia y cols., 2017). Por otro lado, en estos microorganismos se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas tales como: la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (Borowitzka, 2013; Yaakob y cols., 2014).

1.2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS

Según una serie de investigadores (Gonzalez-Bashan y cols., 2000; Cáceres Aravena, 2009; Ortega-Salas y cols., 2012) la curva de crecimiento celular está compuesta por cinco fases, las que se definen por el número de células presentes en un tiempo determinado y por las condiciones generales del cultivo. La fase de latencia, adaptación o lag es la primera fase que suele presentarse (Figura 1.1 a), donde la tasa de crecimiento exponencial es significativamente menor que en la fase

siguiente (exponencial), pudiendo deberse a un periodo de ajuste fisiológico a los cambios en los nutrientes del medio o condiciones de cultivo. También, puede ocurrir si el inóculo posee células no viables, provenientes de la fase estacionaria o cercanas a la senescencia (Lee y cols., 2004), debido a que la edad fisiológica de la célula afecta su capacidad de multiplicación (Becker, 1994).

Luego, se inicia una aceleración del crecimiento para entrar a la fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica (Figura 1.1 b), ya que las células crecen y se dividen en función exponencial del tiempo, en este periodo ningún nutriente ni la luz son factores limitantes para la multiplicación de las células (Becker, 1994; Lee y cols., 2004).

Al final de la fase de crecimiento exponencial, las células se han multiplicado de tal manera que comienzan a “hacerse sombra” unas a otras, limitando el acceso a la luz, además la concentración de algún nutriente disminuye pasando a ser un limitante del crecimiento (Becker, 1994; Lee y cols., 2004), una vez que esto ocurre, la tasa de crecimiento empieza disminuir llegando a la fase de crecimiento lineal o desaceleración (Figura 1.1 c) dando paso a una etapa donde se comienzan a acumular desechos tóxicos de la propia célula y sumado a los factores anteriores, el cultivo alcanza su máxima concentración celular, estancándose en crecimiento en la fase estacionaria (Figura 1.1 d). Finalmente la viabilidad de las células disminuye y comienzan a morir liberando sustancias inhibitorias del crecimiento al medio, lo que es causado por las condiciones ambientales desfavorables, disminuyendo la concentración celular en forma abrupta, lo que es llamado fase de muerte o senescencia (Figura 1.1 e).

Es conocido, que las microalgas pueden variar su composición bioquímica dependiendo de la fase de su ciclo de vida en que se encuentren debido a los grandes cambios fisiológicos a las que están sometidas (Moreno-García y cols., 2017; Salama y cols., 2017), por lo que un sistema de cultivo donde se puedan controlar independientemente estas condiciones, sería ideal para modificar la composición proximal de las microalgas, y así satisfacer de mejor manera las necesidades nutricionales de estados larvales, juveniles tempranos y filtradores en general.

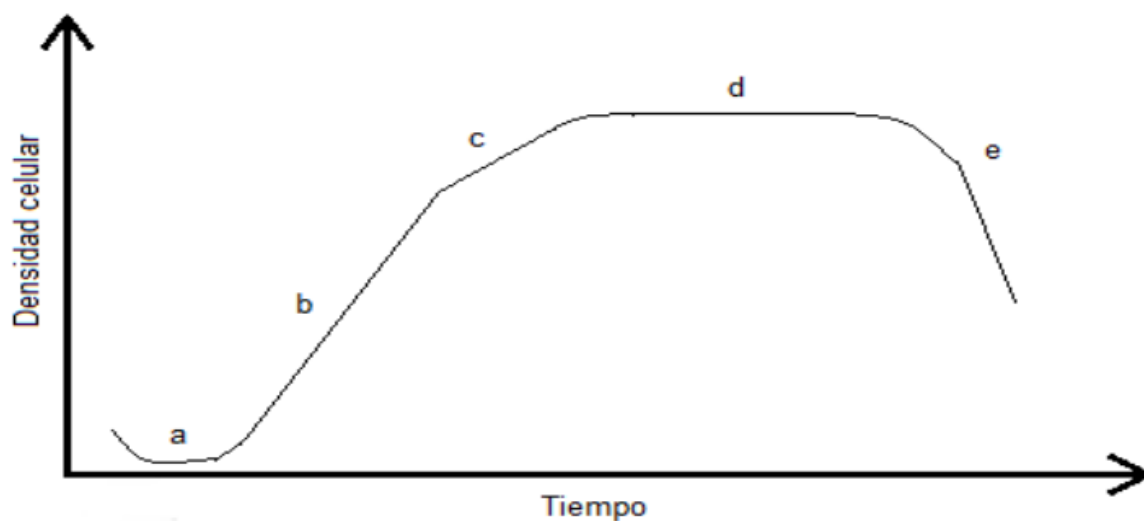


Figura 1.1 Fases de crecimiento de un cultivo microalgal cerrado. Donde las letras a, b, c, d y e corresponden a la fase lag, crecimiento exponencial, crecimiento lineal, estacionaria y senescencia, respectivamente (Becker, 1994).

1.3 PRINCIPALES FACTORES DE CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS

Los factores medioambientales y nutricionales afectan la fotosíntesis, el metabolismo y la composición molecular de la célula, lo cual influye en la producción de biomasa (Arias Peñaranda, 2013). Los parámetros más relevantes para el crecimiento de microalgas se relacionan a continuación, junto a la función fundamental que desempeñan en el cultivo.

1.3.1 INTENSIDAD DE LA LUZ

De la energía que llega al cloroplasto sólo el 40 % corresponde a la luz visible, única radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés). La respuesta de los organismos fotosintetizadores a la energía que les llega, varía en función de las diferentes longitudes de onda. Esto significa que la calidad espectral de la radiación es de gran relevancia en la respuesta de los microorganismos a los cambios de la intensidad de la luz (Deswarte, 2015; Singh y cols., 2015).

La clorofila es el principal pigmento que absorbe luz para el proceso fotosintético. Otros pigmentos accesorios como los carotenoides, xantofilas y ficobilinas también participan en la fotosíntesis

formando parte de los fotosistemas (Yaakob y cols., 2014). Un fotosistema contiene numerosas moléculas de pigmentos antena y un par de moléculas de clorofila que actúan como centro de reacción, atrapando la energía procedente de la absorción de luz (Benavente-Valdés y cols., 2016).

Ante intensidades de luz muy bajas, las microalgas incrementan la producción de clorofila *a* y de otros pigmentos colectores de luz, entre los que se encuentran las clorofilas *b* y *c*, y pigmentos accesorios (D'Alessandro y cols., 2016). Sin embargo, como respuesta a altas intensidades de luz, se produce una disminución en la síntesis de clorofilas, y se estimula la síntesis de ciertos carotenoides (zeaxantina, astaxantina o β -caroteno) que ejercen funciones fotoprotectoras del aparato fotosintético celular (Paliwal y cols., 2016).

Los lípidos son uno de los constituyentes principales de los cloroplastos. Las insaturaciones presentes en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) funcionan como sumideros de radicales libres producidos, en mayor medida, por la pérdida del equilibrio electrónico en los fotosistemas (Hill y cols., 2011), lo que está relacionado con el aumento de la intensidad de luz. Altos contenidos de PUFAs se asocian a niveles bajos de intensidad de luz; sin embargo, al aumentar la intensidad de la luz, aumenta el porcentaje de ácidos grasos saturados. Altas intensidades de luz favorecen también la acumulación de triacilglicéridos con mayor grado de saturación. Por tanto, la elección adecuada de la intensidad de la luz permite mantener un cierto control sobre la producción de biomasa y/o la acumulación de determinados metabolitos de interés (Arias Peñaranda, 2013; Benavente-Valdés y cols., 2016; Pruvost y cols., 2016).

1.3.2 TEMPERATURA

La temperatura es un parámetro del cultivo que presenta una estrecha relación con el resto de los parámetros, sobre todo con la luz y los nutrientes (Ras y cols., 2013). La temperatura óptima del cultivo depende principalmente de la microalga que se emplee y de sus características, pero por otra parte el valor óptimo puede variar en función de los valores de los demás parámetros (Roleda y cols., 2013). Así la temperatura óptima en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural.

Las variaciones en la temperatura del cultivo presentan una respuesta concreta en el crecimiento de la biomasa (Roleda y cols., 2013). La relación entre la temperatura y el crecimiento se distribuye en tres fases: una primera fase en la que el aumento de la temperatura implica el aumento de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la segunda fase, que se corresponde con el óptimo de temperatura (en esas condiciones), a partir del cual si la temperatura continúa aumentando se entraría en la fase tercera en la que la tasa de crecimiento es negativa. La tasa de crecimiento negativa característica de esta fase se puede deber a que las altas temperaturas interrumpan procesos de regulación metabólica o que directamente se produzca la muerte celular (Abalde y cols., 1995).

La temperatura es uno de los factores más importantes que afecta la composición bioquímica de las microalgas debido a su repercusión sobre las reacciones enzimáticas. La temperatura óptima de crecimiento para el fitoplancton está entre 20°C y 24°C, aunque este rango puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo y de la especie. Temperaturas inferiores a 16°C provocan un lento crecimiento de las microalgas, mientras que temperaturas superiores a 35°C son letales para numerosas especies (Singh y cols., 2015).

1.3.3 pH

La importancia del pH en el cultivo de microalgas se debe a que en función de su valor, variará la disponibilidad de los nutrientes y la solubilidad de los gases (afectada también en función de la temperatura) (Bartley y cols., 2014). Al igual que todos los parámetros de cultivo el valor óptimo de pH dependerá de las características de cada microalga. El rango de pH necesario para el cultivo de la mayoría de las especies de microalgas se encuentra entre 7 y 9 (Arias Peñaranda, 2013).

El pH se ve influenciado por todos los parámetros de cultivo ya que el propio medio de cultivo generalmente tiene capacidad tampón. La concentración, solubilidad y consumo de los nutrientes por los microorganismos, afectan los niveles de pH en el medio de cultivo. De este modo el pH presenta una variación a lo largo del cultivo muy relacionada con el desarrollo del mismo (Ale y cols., 2014).

La captación de carbono inorgánico por el fitoplancton, durante la fotosíntesis, provoca un aumento del pH en su medio acuoso (Ramaraj y cols., 2014). La adición de CO₂ al medio de cultivo permite

corregir los altos valores de pH que pueden alcanzarse durante el periodo de crecimiento (Ramaraj y cols., 2015).

1.3.4 NUTRIENTES

La tasa de crecimiento de una microalga disminuye en dependencia de la fuente, disponibilidad y concentración de nutrientes. La respuesta celular normal a la limitación de nutrientes se traduce en una adaptación de los requerimientos nutricionales de la célula, de forma que las tasas fotosintética y respiratoria disminuyen, a medida que aumenta la deficiencia del o los nutrientes limitantes (Markou y cols., 2014; Wang y cols., 2014).

Entre los nutrientes esenciales se puede mencionar al nitrógeno, elemento esencial para la síntesis proteica (Wang y cols., 2014). La mayoría de las microalgas pueden utilizar nitratos, nitritos, amonio o urea como fuentes de nitrógeno para su crecimiento (Salama y cols., 2017), lo que está relacionado con la disponibilidad de la fuente y la especie de microalga (Perez-Garcia y cols., 2011).

El fósforo es otro de los elementos esenciales, presente en numerosas biomoléculas como los ácidos nucleicos, lípidos de membrana e intermediarios metabólicos. Permite la movilización de la energía contenida en enlaces fosfato-fosfato de los nucleótidos y por tanto, es clave para el desarrollo de las microalgas (Singh y cols., 2015).

El azufre está presente principalmente en proteínas, como parte de la estructura de los aminoácidos cisteína, metionina, en cofactores y otras estructuras químicas implicadas en funciones de diversa naturaleza, desde la intervención en procesos redox, hasta las funciones como antioxidante y la resistencia a metales a través de las metalotioneínas (Markou y cols., 2014).

La carencia de uno de estos nutrientes esenciales trae consigo en los cultivos de microalgas una cadena sucesiva de efectos negativos que afectan su viabilidad. La ausencia de nitrógeno, fósforo o azufre puede provocar una reducción en la concentración celular de los pigmentos fotosintéticos y de las proteínas celulares, dificultando así la fijación fotosintética de CO₂ (Cakmak y cols., 2012). En tales situaciones, el flujo de carbono fijado a partir de la fotosíntesis, se deriva mayoritariamente a la síntesis de carbohidratos y lípidos en lugar de dirigirse a la síntesis de proteínas. Esto explica

que la acumulación de lípidos sea una de las principales respuestas de numerosas microalgas cultivadas bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Bartley y cols., 2014; D'Alessandro y cols., 2016).

1.3.5 CARBONO

El carbono presenta una gran importancia debido principalmente a dos factores: es el nutriente más importante porque supone el 50 % de la biomasa y la forma de aplicación es un factor definitorio del tipo de cultivo. El carbono se puede aplicar en dos formas principales: inorgánico CO_2 ; u orgánico en forma de azúcares o acetato (Chandra y cols., 2014).

El aire es fundamental para el crecimiento de las microalgas, puesto que provee la fuente de carbono inorgánico necesaria para la fotosíntesis en forma de CO_2 (0,038 %) (Le Quéré y cols., 2009). La aireación tiene como ventajas añadidas facilitar la mezcla del cultivo; impedir la sedimentación celular; favorecer la exposición de las células a la luz y a los nutrientes; y mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (Wang y cols., 2008).

Para no limitar el crecimiento del cultivo y mejorar la productividad, especialmente en cultivos muy densos, resulta necesario el abastecimiento de un suplemento de CO_2 en aire, normalmente hasta niveles que pueden alcanzar el 5 % (v/v) o incluso superiores (Hsueh y cols., 2009).

1.4 BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS: APLICACIONES INDUSTRIALES

La primera microalga aislada y mantenida en condiciones axénicas fue *Chlorella vulgaris* en 1890; sin embargo, no fue hasta la década de 1940, que se iniciaron los estudios sobre la fisiología y bioquímica de estos microorganismos. La idea de producir microalgas a gran escala tuvo su origen en Alemania durante esta década, específicamente diatomeas (Nezammahalleh y cols., 2016). En 1951, el Instituto Carnegie de Washington financió la construcción en Massachusetts de la primera planta piloto para la producción de microalgas. Otro centro importante dedicado a esta producción durante esos años fue el Instituto Tokugawa de Tokio, donde se llevaron a cabo estudios sobre el cultivo de *Chlorella* en una planta piloto al aire libre (Guerrero y cols., 1999; Hristov, 2010).

Entre los usos comerciales, la generación de productos con aplicación industrial constituye en la actualidad el aspecto central de la Biotecnología de microalgas (Acién y cols., 2018). Muchas especies producen como resultado de su metabolismo, diferentes compuestos biológicos de interés para las industrias químicas o farmacéuticas (Enzing y cols., 2014; Fiedor y cols., 2014; Salama y cols., 2017).

Estas biomoléculas pueden acumularse como parte de la biomasa del alga o en algunos casos, liberarse al medio externo. De igual forma, se pueden acumular productos específicos en respuesta a situaciones de limitación de algún nutriente o presencia de algún compuesto. Si estas condiciones se simulan en los sistemas de cultivo, se puede conseguir que el metabolismo celular se dirija hacia la biosíntesis de productos de interés (Montero-Sánchez y cols., 2012), lo que fundamenta el uso de las microalgas en Biotecnología.

1.4.1 USOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las microalgas sintetizan y acumulan gran variedad de carbohidratos como almidón o glucógeno, fácilmente digeribles y sin restricciones para su uso como fuente de alimento (Grung y cols., 1992). Sin embargo, su consumo es escaso salvo en algunas regiones de Asia. Los polisacáridos producidos por *Pophyridium* o *Rhodella*, así como los de muchas cianobacterias, tienen aplicación como espesantes en diversos sectores industriales como: alimentación, cosmética, fabricación de pinturas, entre otros. Este mercado aún es restringido debido a la existencia de alternativas más económicas como, los polisacáridos producidos por macroalgas (carrageno, fucoidano o agar) o por plantas superiores (goma xantano) (Del Campo y cols., 2007).

Los PUFA's de cadena larga como: γ -linoleico, araquidónico, eicosapentaenóico (EPA, por sus siglas en inglés) o docosahexaenóico (DHA, por sus siglas en inglés), se encuentran frecuentemente en la composición lipídica de las microalgas, constituyendo un mercado bien establecido tanto en alimentación humana como animal (acuicultura). Asimismo, las microalgas contienen fitoesteroles y vitaminas usados principalmente como constituyentes de alimentos funcionales (Del Campo y cols., 2007) que valorizan la biomasa algal.

Por otra parte, la biomasa de microalgas es rica en pigmentos que se utilizan como colorantes alimentarios y precursores de vitaminas. En acuicultura, tienen aplicación para mejorar la supervivencia y maduración del sistema inmune; así como, la pigmentación de la carne de pescados y crustáceos (Benavente-Valdés y cols., 2016). Estos pigmentos también son útiles como colorantes en las industrias alimentaria y cosmética.

1.4.2 USOS EN LA AGRICULTURA

Las microalgas pueden ser utilizadas como fertilizantes en la agricultura sostenible. Dentro de las comunidades microbianas desarrolladas en los suelos, las microalgas y cianobacterias juegan un papel fundamental en la recirculación y biodisponibilidad de elementos importantes como el fósforo, y por tanto, en el acondicionamiento de suelos agrícolas (Holland, 2015). Históricamente, en los campos de arroz del sureste asiático, cianobacterias del género *Azolla* se han utilizado como fertilizantes por su capacidad de fijar nitrógeno (Panou y cols., 2016). En general, cianobacterias y microalgas se usan para incrementar la productividad de cultivos de frutales y leguminosas (Masojidek y cols., 2004; Ho y cols., 2011).

1.4.3 USOS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Los carotenoides muestran una gran diversidad en su distribución, estructura y función. Muchos estudios han puesto de manifiesto la poderosa actividad antioxidante tanto de β -caroteno como astaxantina y cantaxantina (Hu, 2004; Fiedor y cols., 2014; Gong y cols., 2016; Paliwal y cols., 2016). Estos compuestos actúan secuestrando radicales libres de oxígeno, directamente relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas lo que constituye un beneficio para la salud humana y animal, previniendo o retrasando algunas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, entre otras (Merchant y cols., 2006).

Las microalgas producen una amplia gama de fitoesteroles tales como: brasicasterol, sitosterol y estigmasterol, dependiendo de la afiliación taxonómica del alga. El contenido de esteroides puede ser modificado cambiando las condiciones de crecimiento (Borowitzka, 2013) y se ha demostrado que tienen bioactividad *in vivo* (Francavilla y cols., 2012). Estos fitoesteroides de algas pueden tener aplicaciones farmacéuticas o en alimentos funcionales (Sioen y cols., 2011). El mercado global de fitoesteroides actualmente es de alrededor de \$ 300 millones de dólares y crece a razón de 7 %-9 %

por año; sin embargo, el potencial de las microalgas como fuentes de fitosteroles aún no ha sido totalmente explorado (Borowitzka, 2013).

El rango de bioactividades reportadas a partir de extractos de microalgas en los últimos 50-60 años es muy amplio e incluye antioxidantes, antibióticos, antivirales, compuestos anticancerígenos, antiinflamatorios, entre otros (Borowitzka, 2013). Muchas microalgas, especialmente los dinoflagelados y las cianobacterias, también producen toxinas potentes que tienen algunas aplicaciones en la investigación y como compuestos principales para el desarrollo de fármacos (Moreno-Garcia y cols., 2017).

1.4.4 LAS MICROALGAS EN LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL: POTENCIAL PARA LA BIORREMEDIACIÓN

La posibilidad disponer de una fuente de carbono económica hace que se esté valorando el cultivo de microalgas a escala industrial en instalaciones anexas a grandes centros de emisión de CO₂, como las centrales térmicas y cementeras. Esto persigue como objetivos, reducir las emisiones de estas instalaciones y generar un producto con diversas aplicaciones (Merchant y cols., 2006; Gould y cols., 2008; Cardol y cols., 2011; Cubero, 2013).

El oxígeno es un elemento clave en el proceso de depuración de aguas residuales urbanas para la oxidación de la materia orgánica, por un consorcio de bacterias. De manera tradicional, este oxígeno se suministra por equipos con un importante costo energético. El oxígeno producido por los cultivos de microalgas, como resultado de la fotosíntesis, supone una clara mejora en el proceso. Asimismo, las microalgas favorecen la retirada de nitrato, fosfato e iones metálicos. Para dar salida a esta biomasa de microalgas se plantea la instalación de plantas de biogás y generación de calor o electricidad a partir de la biomasa algal (Halim y cols., 2012; Arias Peñaranda, 2013). El cultivo de microalgas puede usarse para la biorremediación de efluentes provenientes de actividades no solo domésticas, sino industriales y agrícolas, eliminando sustancias altamente contaminantes como compuestos fenólicos y pesticidas.

1.4.5 LAS MICROALGAS COMO FUENTE DE BIOCOMBUSTIBLES

El potencial de la biomasa de microalgas, como fuente de materia prima para la obtención de biocombustibles, se basa en su rápido crecimiento y alta productividad. Estas no tienen

competencia con la agricultura tradicional, pueden usar aguas residuales, salobres o marinas y presentan un elevado contenido en aceite y/o azúcares (Mata y cols., 2014). Se estima que para cubrir la demanda global de combustibles, debería destinarse a cultivos de microalgas unos seis millones de hectáreas, lo que supone menos del 0,4 % de la superficie cultivable (Ribeiro y cols., 2015).

La producción de biogás (metano e hidrógeno), a partir de microalgas, tiene lugar por digestión anaerobia de la biomasa o los residuos obtenidos tras la obtención de diversos componentes (Kumar y cols., 2014; Moody y cols., 2014). La producción de hidrógeno a partir de biomasa, puede realizarse mediante procesos físico/químicos energéticamente costosos como la gasificación, pirólisis y licuefacción. También, este elemento puede obtenerse por medio de procesos biológicos como la fotólisis del agua, foto-descomposición de la materia orgánica por bacterias fotosintéticas; y fermentación o sistemas híbridos en los que interviene la fotosíntesis y bacterias fermentativas (Deswarte, 2015).

Los azúcares algales (almidón y glucógeno) se pueden fermentar para la producción de bioetanol. El proceso pasa por un pretratamiento de la biomasa, una hidrólisis, posterior fermentación y separación del producto final (Moreno-Garcia y cols., 2017).

La composición lipídica, rica en ácido palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico y linoléico, hacen de la biomasa de microalgas una excelente materia prima para ser utilizada en el proceso de transesterificación para la generación de biodiésel (Lamers y cols., 2012; D'Alessandro y cols., 2016). Por último, la forma más básica de generación de energía a partir de la biomasa de microalgas consiste en la combustión directa de la misma, generando calor y electricidad (Acién y cols., 2018).

La posibilidad de explotar comercialmente todo el potencial de productos derivados de microalgas (biorrefinería) puede hacer económicamente factible su escalado (Acién y cols., 2018). Este concepto integral, que implica extraer de la biomasa distintos subproductos hasta obtener un residuo final, necesita aún del desarrollo de tecnologías de separación sin dañar o impedir el aprovechamiento de otros compuestos, de forma económica y con un bajo consumo energético (Perez-Garcia y cols., 2011).

1.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Para el establecimiento de un proceso de producción de microalgas para la obtención de un compuesto de interés, es de crucial importancia la selección de las condiciones de operación y el sistema de cultivo. Hay multitud de maneras de llevar a cabo el cultivo de microalgas pero se pueden dividir principalmente en dos: cultivos al aire libre y cultivos en sistema cerrado (Grima y cols., 2003; Cubero, 2013; Moreno-Garcia y cols., 2017).

El cultivo al aire libre se lleva a cabo en su mayoría en estanques artificiales tipo *raceway*. También se da el cultivo en estanques de otros tipos: circulares, superficiales, profundos, entre otros (Salama y cols., 2017). Esta forma de cultivo requiere grandes superficies en zonas con alta iluminación, con un coste de instalación muy bajo. El cultivo al aire libre presenta multitud de inconvenientes como pueden ser: las variaciones climáticas, la contaminación, difícil control de la concentración de nutrientes y de la temperatura; y producción menor en comparación con los cultivos cerrados. A parte de la falta total de control en las condiciones de cultivo, el principal problema de esta forma de cultivo es la contaminación con especies indeseadas (Grima y cols., 2003).

Los sistemas de cultivo cerrados, de mayor sofisticación tecnológica, representan la alternativa a los estanques abiertos, aportando mejores condiciones para cultivar cualquier microalga al dificultar la invasión por organismos contaminantes (Grima y cols., 2003). De hecho algunas microalgas solo pueden ser cultivadas en reactores cerrados puesto que se contaminan con facilidad. Existen varios diseños de reactores cerrados, siendo el reactor tubular el ejemplo más representativo, considerándose los reactores planos un punto intermedio entre los sistemas de cultivos abiertos y cerrados.

Los reactores cerrados son apropiados para el cultivo de microalgas que generen productos de interés de elevado valor comercial, puesto que el coste de construcción y mantenimiento de estos reactores es elevado (Acién y cols., 2018). Este hecho, unido al riesgo de inhibición de la fotosíntesis por la presencia de oxígeno, y la complejidad de su escalado, suponen los inconvenientes principales de los sistemas de cultivo cerrados. Los sistemas cerrados presentan múltiples ventajas frente a los reactores abiertos como un uso más eficiente de la luz, que conduce a la producción de cultivos más concentrados, la posibilidad de cultivar todo el año, una disminución

de las pérdidas por evaporación, un mejor control de algunas variables como la temperatura y mayor facilidad de operación en continuo. El diseño del reactor debe tener en cuenta el flujo idóneo y el adecuado intercambio gaseoso, además de maximizar la captura de luz, a la vez que se minimiza la ocupación de superficie (Grima y cols., 2003).

1.6 EXPERIENCIAS ACUMULADAS SOBRE EL EFECTO DE CME EN CULTIVOS DE MICROALGAS

Los efectos del campo magnético sobre microorganismos pueden clasificarse en: no observables, inhibitorios o estimulantes. Esto depende de la inducción del campo magnético expresada en Teslas (T) o en Gauss (G) (Dini y cols., 2005); así como la frecuencia de la corriente eléctrica que lo indujo, en caso de campos electromagnéticos (Anaya, 2015).

Son numerosas las experiencias con campos magnéticos y electromagnéticos, aplicados a microalgas, con el propósito de lograr algún efecto biológico que pueda traducirse en mejoras del manejo de cultivos a escala comercial (Tabla 1.1). De todas las especies ha sido *Chlorella* la que más se ha usado como modelo biológico, siendo relevantes los trabajos de Wang, Hirano, Luna y cols. (Hirano y cols., 1998; Wang y cols., 2004; Wang y cols., 2005; Wang y cols., 2006; Wang y cols., 2007; Wang y cols., 2008; Luna y cols., 2011).

Generalmente estas especies se han trabajado en el rango entre los 10 y 300 mT, aplicando el CME desde 1 min. hasta 11 horas, o de forma permanente, lo que ha permitido obtener valiosos resultados en cuanto al crecimiento celular y biosíntesis de biomoléculas. Estos hallazgos indican que los campos magnéticos causan disímiles efectos en sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, modifican el metabolismo de los microorganismos e influyen en los procesos de síntesis de carbohidratos, proteínas, pigmentos y almacenamiento de aminoácidos esenciales, entre otras (Yang y cols., 2011; Cardias, 2014; Deamici y cols., 2016).

Tabla 1.1. Resumen de tratamientos magnéticos en microalgas y cianobacterias.

MICROALGA	ESQUEMAS DE APLICACIÓN	INDUCCIÓN DEL CM	EFFECTO BIOLÓGICO
<i>Chlorella vulgaris</i> (Wang y cols., 2008)	12 h	10–50 mT	–Incremento del crecimiento (100 %). –Estimula defensa antioxidante. –Elevada actividad de superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. –Aumento de la peroxidación lipídica. –Aumenta la velocidad de crecimiento específica
<i>C. vulgaris</i> (Gómez y cols., 2007)	30 min al 7 ^{mo} día	70 mT	–Incremento del crecimiento en 2,5 veces respecto a controles.
<i>C. vulgaris</i> (Gomez Luna y cols., 2011)	1h y permanente al 7 ^{mo} día	30 mT	–Incremento de la densidad celular. –Aumento de la concentración de pigmentos.
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Gómez y cols., 2009)	15min, 30min y 1h en el 7 ^{mo} día	30 mT	–Incremento de la densidad celular. –Aumento de la concentración de pigmentos.
<i>Spirulina platensis</i> (Hirano y cols., 1998)		10 mT	–Incremento del crecimiento en un (50 %).
<i>Dunaliella salina</i> (Fuse, 1992)		10-23 mT	–Incremento del crecimiento celular en (90 %).
<i>Spirulina sp.</i> (Deamici, 2016)	24 h d ⁻¹	30 y 60 mT	–Incremento de biomasa microalgal. –Estimula la síntesis de carbohidratos –Estimula la síntesis de proteínas
<i>Chlorella fusca</i> (Deamici, 2016)	24 h d ⁻¹	30 y 60 mT	–Incremento de la concentración celular. –Aumento de la concentración de carbohidratos
<i>Chlorella vulgaris</i> (Yang, 2011)		240-300 mT	–Incremento de concentración de proteínas

Wang y cols. cultivaron *Chlorella* con aplicación de un tratamiento magnético circulante en un campo electromagnético constante y analizó los cambios en su crecimiento y acumulación de elementos (Wang y cols., 2008). La investigación indicó que las diferentes fuerzas del campo electromagnético evaluadas tienen diferentes efectos sobre el crecimiento de este microorganismo, mejorando la acumulación de microelementos especialmente iones metálicos, en dependencia del campo electromagnético aplicado.

Li (Li y cols., 2007), Hirano (Hirano y cols., 1998), Wang (Depei y cols., 1998) y cols. realizaron sus experimentos aplicando campo magnético y electromagnético a *Spirulina*. Estos investigadores observaron que el tratamiento magnético estimula el crecimiento de este microorganismo, aumenta el contenido proteico y de azúcares y acorta el período de cultivo entre dos y tres días.

El interés por la estimulación bioelectromagnética de cultivos para aplicaciones biotecnológicas y bioenergéticas, ha aumentado (Hunt y cols., 2009). En los estudios realizados no solo se han usado campos estáticos; también se han utilizado campos electromagnéticos de baja frecuencia. La respuesta de las microalgas a la acción de estos agentes físicos, indica que gran número de bioprocesos pueden ser sucesivamente integrados a esta tecnología, si las condiciones del cultivo lo permiten. Cada especie utilizada tendrá su propia respuesta a la estimulación magnética, la cual dependerá del esquema de aplicación empleado.

Materiales y Métodos

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE: *CHLORELLA VULGARIS* BEIJERINCK

Para realizar esta investigación se utilizó una cepa de *Chlorella vulgaris* Beijerinck aislada del medio local en el año 2002, específicamente de un estanque dedicado al cultivo de ciprínidos en la estación de acuicultura de Maffo, Contramaestre. La cepa se mantiene en el cepario del Laboratorio de Ecotoxicología y Servicios Ambientales (LESA) del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) con el código F010102-A. Este microorganismo se conserva en condiciones controladas, en el Banco Maestro y en el Banco de Trabajo, en medio Bristol sólido y líquido (Figura 2.1).

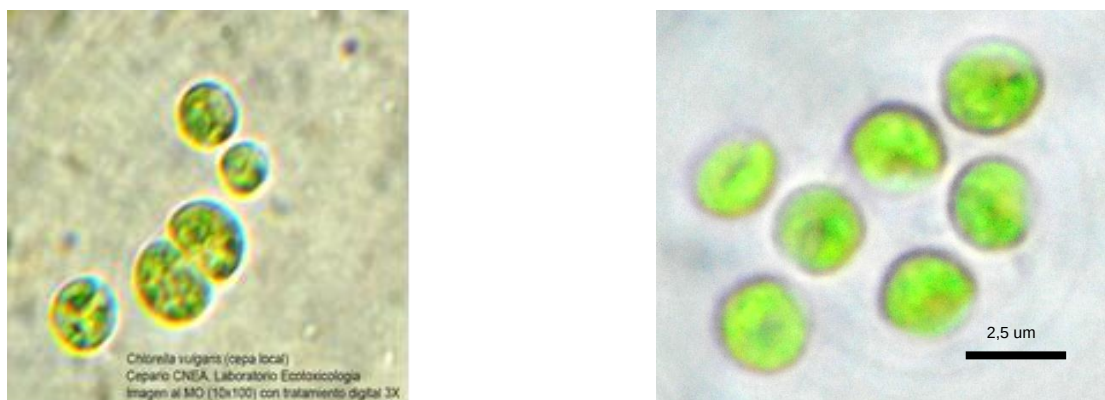


Figura 2.1. Imágenes de *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Cepario del LESA (aumento 40x).

Chlorella vulgaris Beijerinck es un alga verde unicelular de agua dulce; las células se presentan aisladas aunque eventualmente pueden formar agregados; tiene forma esférica (Sant'Anna, 1984) y un tamaño que oscila entre 2 y 6 µm. La especie local *Chlorella vulgaris*, puede llegar a medir 2,5 µm. Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular (Sant'Anna, 1984). Se reproduce solamente por autosporas (Van den Hoek y cols., 1995). Presenta una pared celular fina, lisa, celulósica y rígida, compuesta fundamentalmente por esporopolenina, politerpeno resistente a la degradación (Van den Hoek y cols., 1995).

2.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* BEIJERINCK

2.2.1 PRE-INÓCULOS E INÓCULOS

A partir de un cultivo sólido, en cuña de agar, se desarrolló un subcultivo matriz unialgal asincrónico de la cepa local de *C. vulgaris* Beijerinck con aireación, sin suministro extra de CO₂ y con un régimen de luz continua, a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 1 000 lx (19,5 $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$). La intensidad de la luz se aumentó progresivamente en tres cultivos sucesivos hasta que la cepa estuvo completamente adaptada a 75 $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$. Este subcultivo constituye el punto de partida para el establecimiento de los cultivos densos. En todos los casos los inóculos se realizaron a partir de subcultivos en la fase exponencial del crecimiento.

2.2.2 MEDIO DE CULTIVO

Para el mantenimiento y desarrollo de subcultivos y cultivos densos se utilizó el medio de cultivo Bristol modificado por Gómez (Gómez, 1997), el cual se detalla a continuación. Se utiliza el nitrato de sodio (NaNO₃) como fuente de nitrógeno (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo Bristol modificado.

Macroelementos	Concentraciones (g L ⁻¹)	Oligoelementos
NaNO ₃	1,000	Solución de Algal (8,3 g L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,025	(EDTA 39,80 % + Fe 10,20 % + Zn 0,53 % + Mn 0,44 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075	+ Mo 0,56 % + Co 0,46 % + Cu 0,49 % + Tiamina 0,162 %
K ₂ HPO ₄	0,075	+ Biotina + Cianocobalamina 0,008 %
KH ₂ PO ₄	0,175	+ Excip. Vit 0,390 %)
NaCl	0,250	

La solución de oligoelementos se preparó a partir de la formulación comercial Algal de Nutrición Avanzada. Esta solución se esterilizó a 120°C durante 25 min., se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y posteriormente se mezcló con la solución de macroelementos.

2.2.3 CONDICIONES GENERALES DE LA INSTALACIÓN

2.2.3.1 INTERFERENCIA ELECTROMAGNÉTICA

Los cultivos se desarrollaron en una instalación en la que se determinó *a priori* la interferencia electromagnética de campos de baja frecuencia. El valor de dicha interferencia estuvo en el rango de 0,03 a 0,23 μT , dentro del límite restrictivo, que en este caso se refiere a la directriz asumida por Suecia (0,25 μT). Considerando que se tratan de eliminar interferencias en una instalación para la experimentación, los cultivos fueron ubicados en aquellos lugares donde se garantiza una exposición menor que 0,25 μT (Luna y cols., 2009).

2.2.3.2 TEMPERATURA E ILUMINACIÓN

Las condiciones de temperatura, en la cámara de cultivo, se mantuvieron estables a un valor de $22 \pm 2,3^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del $62,5 \pm 3,1\%$. La temperatura de los cultivos se determinó con un termómetro digital (Quarts Oregon Scientisc, China) sumergido en agua destilada.

Para mantener iluminados los cultivos en régimen de luz continua, se utilizaron cuatro lámparas fluorescentes Daylight TL-D 36W/54-765 (PHILIPS, China). La intensidad de la luz se ajustó diariamente con una estación meteorológica de bolsillo (TP LM 8000 4 en 1, China, error: $\pm 8\text{ lx}$). Se midieron, además, con este instrumento los valores de humedad relativa (error: $\pm 4\%$).

2.2.3.3 AIREACIÓN DE LOS CULTIVOS

Los cultivos fueron aireados mediante burbujeo de aire filtrado con pre-filtros de jeringa de microfibra de vidrio (MIDISART 2000, Bélgica) de 0,20 μm . El flujo de aireación se mantuvo relativamente constante a $0,45\text{ L min}^{-1}$. Estas condiciones permiten un crecimiento uniforme y aporta a los cultivos una cantidad mínima de CO_2 (0,03 %) que es la que está presente en el aire,

que favorece a los cultivos al actuar como fuente de carbono y permitir su tamponamiento (Abalde y cols., 1995) (Anexo 2).

2.2.3.4 pH

Durante la preparación del cultivo se midió el pH con un equipo (Mettler Toledo AG, China) y se ajustó a pH 7, modificando el pH descrito por el Medio Bristol, ya que experimentos previos mostraron que a este valor de pH se obtienen mejores concentraciones celulares del cultivo (Wemba, 2017). Posteriormente, se realizaron mediciones de este parámetro en días alternos para evaluar sus cambios durante el desarrollo de los experimentos, y ajustar sus valores en caso necesario.

2.3 DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

2.3.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DENSOS

Se establecieron cultivos densos unialgales (Anexo 2) discontinuos de 350 mL a partir del inóculo antes descrito, en frascos cilíndricos de vidrio, de 6 cm de diámetro y 400 mL. La concentración celular inicial fue de $68,0 \pm 3,0 \times 10^4$ cél.mL⁻¹, aproximadamente. Para el desarrollo de los mismos se utilizó la formulación base Bristol, descrita anteriormente. Como fuente de nitrógeno se utilizó el nitrato de sodio con la concentración original establecida en el medio de cultivo (1 g L⁻¹).

Para el desarrollo de cultivos densos se utilizó una DFF de 3 000 lux, equivalente a 58,59 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; esta fue ajustada diariamente utilizando una estación meteorológica de bolsillo, descrita previamente.

2.3.2 METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

2.3.2.1 EXPOSICIÓN DE LOS CULTIVOS A UN CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO

Los cultivos se expusieron a seis protocolos de aplicación de un CME de 47,23 mT (Figura 2.2), manteniendo cultivos control (sin aplicación de CME) para analizar comparativamente el efecto de este agente físico sobre la cinética de crecimiento, la concentración celular máxima, la variación de la viabilidad, la concentración de oxígeno disuelto y los parámetros productivos.

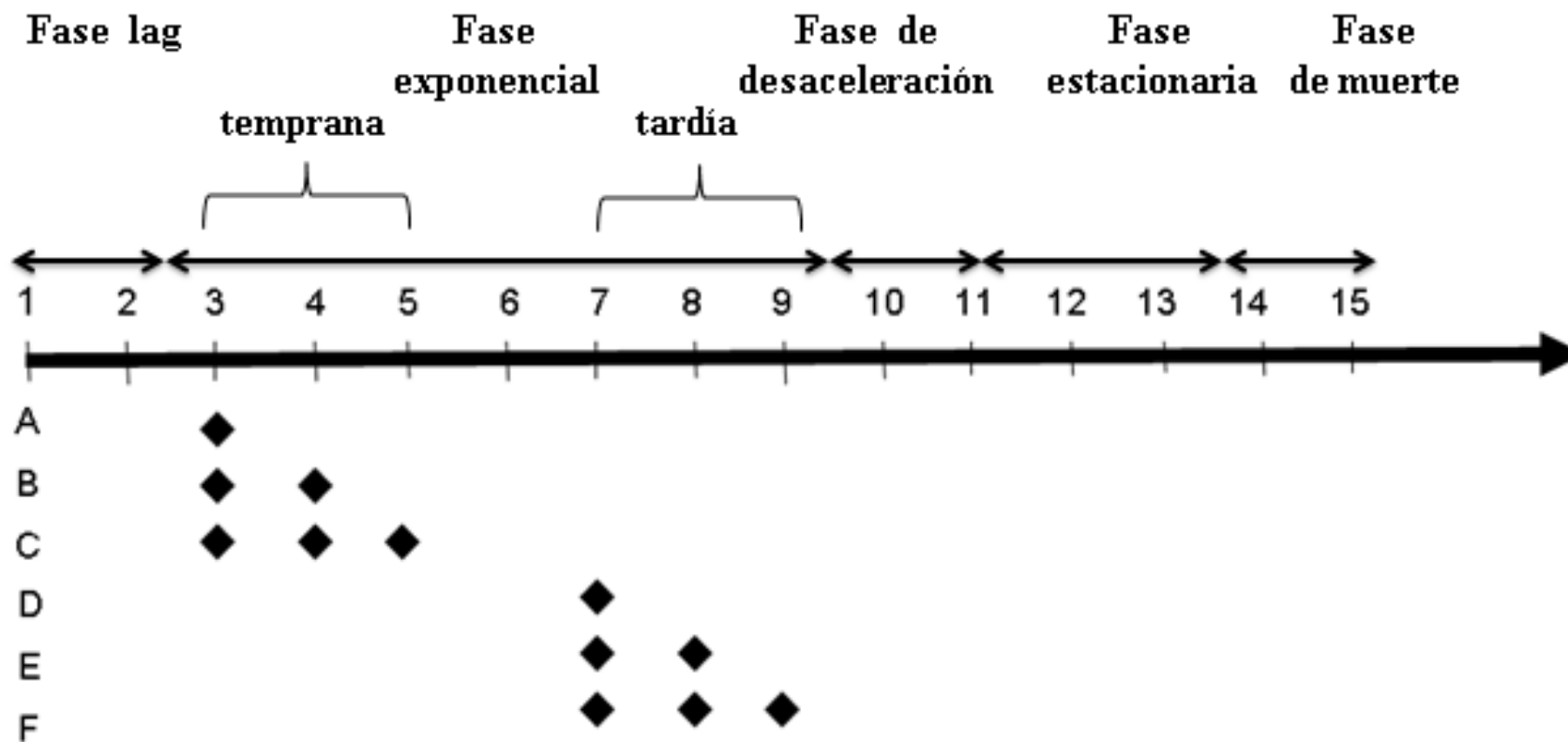


Figura 2.2. Esquemas de aplicación del CME no homogéneo de 47,23 mT.

En la figura 2.2 los esquemas experimentales aplicados son:

- A. Una hora de exposición al CME el tercer día de cultivo (fase exponencial temprana).
- B. Una hora de exposición al CME el tercer y el cuarto día de cultivo (fase exponencial temprana).
- C. Una hora de exposición al CME el tercer, el cuarto y el quinto día de cultivo (fase exponencial temprana).
- D. Una hora de exposición al CME el séptimo día de cultivo (fase exponencial tardía).
- E. Una hora de exposición al CME el séptimo y el octavo día de cultivo (fase exponencial tardía).
- F. Una hora de exposición al CME el séptimo, el octavo y el noveno día de cultivo (fase exponencial tardía).

La selección de estos esquemas estuvo basada en recomendaciones de experimentos previos (Luna y cols., 2009; Luna y cols., 2011; Wemba, 2017). Los esquemas propuestos constituyen nuevos arreglos para entender la respuesta del cultivo ante situaciones de perturbación extrema, con dosis repetida en diferentes momentos de la fase exponencial. El diagrama con la lógica experimental de la investigación se presenta en el Anexo 1.

2.3.2.2 DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO DE IMANES

Los cultivos se expusieron a un campo magnético estático no homogéneo con un valor promedio de 47,23 mT (Anexo 3). El dispositivo para el tratamiento magnético, fue construido y caracterizado en el CNEA. La inducción magnética se seleccionó considerando el rango efectivo recomendado por varios autores, el cual se encuentra entre 10 y 300 mT (ver Tabla 1.1).

2.4 DETERMINACIONES SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO

2.4.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS

El recuento celular se realizó diariamente durante los días de cultivo, con una cámara de recuento hematológico mejorada (Neubauer, China), utilizando una alícuota de 1 mL. Se realizaron diluciones de esta alícuota en agua destilada, de forma tal que el número de células por campo de recuento en 1 mm² estuvo entre 10 y 150 células. Para la observación se utilizó un microscopio óptico (Motic, Alemania) con un aumento de 40x, expresándose los resultados en cél. mL⁻¹. Los

resultados permitieron graficar la curva de la cinética de los cultivos y determinar la máxima concentración celular (K_{max}) alcanzada con cada tratamiento.

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

2.4.2.1 DETERMINACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO MEDIA Y EL TIEMPO DE DUPLICACIÓN

En general, la velocidad de crecimiento poblacional de un microorganismo varía en función de las condiciones ambientales y el tiempo del cultivo. Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o de biomasa. Para ello se utilizaron principalmente los parámetros poblacionales definidos como velocidad específica de crecimiento, también conocida como tasa de crecimiento (μ), y el tiempo de duplicación o de generación (t_g).

A partir de los valores del recuento celular se calculó la tasa de crecimiento (μ) que corresponde al inverso del tiempo de duplicación (t_d), tiempo necesario para que N células se transformen en $2N$ células durante la fase de crecimiento exponencial mediante la ecuación 2.1:

$$\mu = (\ln(N_t) - \ln(N_0)) / (t_t - t_0) \dots \dots \dots (2.1)$$

Donde: N_t y N_0 son las densidades celulares (cél.mL^{-1}) a los tiempos t_t y t_0 , respectivamente, y t_0 y t_t son el primer y el último día de la fase logarítmica, respectivamente (Fidalgo, 1995).

El tiempo de duplicación y/o de generación (t_g) es el tiempo necesario para que se duplique la población y se representa en días (d). Cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado mediante la ecuación 2.2:

$$t_g = 0,693 / \mu \dots \dots \dots (2.2)$$

Donde: μ es la tasa de crecimiento media.

2.4.3 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIGMENTOS

Los pigmentos fueron extraídos con acetona al 90 % (UNI CHEM[®], China) a partir de la biomasa fresca recogida por centrifugación de 1 mL de cultivo a 4 722 g (8 000 r.p.m.) por 10 min., en una centrífuga de mesa para viales (Sigma, Alemania). La extracción se realizó en completa oscuridad,

24 h a -7°C , previa sonicación en una sonda ultrasónica (SONICS[®], Estados Unidos) durante 1 min., con pulsos durante 50 s y 10 s, a una amplitud del 100 % (32 W, 654 J) y agitación en vortex (WiseMix Vm-10, Corea) por 30 s. Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 15 000 g (5 000 r.p.m.) por 10 min., previo análisis espectrofotométrico.

La determinación de clorofilas *a*, *b* y carotenoides se realizó con un Espectrofotómetro (ThermoGenesys 10 uv, China) determinando la absorbancia a 480; 630; 647 y 664 nm. Como blanco se empleó acetona al 90 %, usando cubetas de metacrilato. La concentración de cada uno de los pigmentos se determinó mediante las ecuaciones (2.3-2.6) (Jeffrey y cols., 1975) y se expresa en ($\mu\text{g mL}^{-1}$):

$$\text{Clorofila } a = 11,93A_{664} - 1,93A_{647} \dots\dots\dots (2.3)$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,50 A_{664} \dots\dots\dots (2.4)$$

$$\text{Clorofilas totales} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b \dots\dots\dots (2.5)$$

$$\text{Carotenoides} = 4,0 A_{480} \dots\dots\dots (2.6)$$

La determinación espectrofotométrica de pigmentos se realizó desde el primer día hasta el día trece de los cultivos. A partir de estos valores, se evaluó la relación clorofila:carotenoides, para seguir el estado de los cultivos.

2.4.4 DETERMINACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO

La determinación de oxígeno disuelto (OD) se realizó diariamente en los cultivos, utilizando un medidor de oxígeno disuelto portátil (Mettler Toledo, China). La concentración de este parámetro se expresó en mg L^{-1} .

2.4.4.1 DETERMINACIÓN DE LA TASA DE EVOLUCIÓN DE OXÍGENO FOTOSINTÉTICO

La tasa de evolución del oxígeno fotosintético se midió por el método descrito por Tu (Deng y cols., 2004; Tu y cols., 2015). Los cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck se mantuvieron bajo iluminación continua a temperatura constante. Se realizó la medición del OD según se describe en el epígrafe anterior; los días seis y siete para los cultivos expuestos durante la fase exponencial

temprana; y once y doce para los expuestos durante la fase exponencial tardía. La tasa de evolución del oxígeno fotosintético (POER, por sus siglas en inglés) se expresa en $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl-a}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y se calculó mediante la ecuación 2.7:

$$\text{POER} = \text{DO}_{t_2} - \text{DO}_{t_1} \times 10^6 / 32 \times \text{Chl-a} \times h \dots\dots\dots(2.7)$$

Donde: DO_{t_2} y DO_{t_1} representan el contenido de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en el tiempo t_2 y t_1 , respectivamente, Chl-a representa el contenido de clorofila *a* (mg L^{-1}) y *h* el intervalo de tiempo (en horas) entre la dos mediciones de concentración de OD.

2.4.4.2 DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PRODUCCIÓN DE OXÍGENO

La tasa de producción de oxígeno (R_{O_2}) se expresa en $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y se determinó como se describe en la ecuación 2.8 (Tu y cols., 2015):

$$R_{O_2} = R_{max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} \cdot e \cdot t}{O_{2 \max}} + 1 \right] + \left[\frac{R_{max} \cdot e \cdot t}{O_{2 \max}} + 1 \right] + 1 \right\} \dots\dots\dots(2.8)$$

Donde: $O_{2 \max}$ y R_{max} se refieren al oxígeno máximo acumulado (mg L^{-1}) y la tasa máxima de producción de oxígeno ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), respectivamente, durante el tiempo de cultivo (*t*).

2.4.5 OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO ÓPTICO

Las células en cultivo fueron observadas en un microscopio óptico de campo brillante Motic, y en un microscopio invertido (Zeiss-AxioVert. A1, Alemania), con el objetivo de analizar el estado de las células y obtener imágenes con buen contraste para detectar cambios en la morfología celular, así como visualizar la presencia de otros microorganismos contaminantes (Anexo 4).

2.4.6 DETERMINACIÓN DE LA MATERIA SECA

Para la determinación del peso seco se centrifugaron 200 mL de cultivo en una centrífuga refrigerada (Sigma 3-16KL, Alemania) a 4500 r.p.m. por 15 min., a 20°C. Posteriormente el pellet se lava con agua destilada filtrada con membranas de 0,25 μm , para eliminar restos del medio. Esta biomasa se llevó a cápsulas de porcelana previamente pesadas, donde se seca en estufa (Boxun, China) a 60°C durante 24 horas hasta peso constante, dejando enfriar a temperatura ambiente en una desecadora. Luego se realizó el pesaje en una balanza digital analítica (OHAUS PA114C,

Estados Unidos) con error $\pm 0,1$ %. A partir del peso seco, se calculó la productividad de los cultivos a través de las ecuaciones 2.9 y 2.10:

Materia seca por volumen o concentración de biomasa seca:

$$CB = \frac{PC_{\text{Biomasa}} - PC_{\text{Vacía}}}{V_{\text{Muestra}}} \dots \dots \dots (2.9)$$

CB: Concentración de biomasa seca (g L^{-1}).

PC_{Biomasa} : Peso de cápsula de porcelana con biomasa (g).

$PC_{\text{Vacía}}$: Peso de cápsula de porcelana vacía (g).

V_{Muestra} : Volumen de muestra (L).

Cálculo de la productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$):

$$PB = \frac{CB}{t_{\text{cultivo}}} \dots \dots \dots (2.10)$$

PB: Productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$).

t_{cultivo} : Tiempo del cultivo (días).

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Se utilizó el estadígrafo t para comparar muestras dependientes y seleccionar el esquema de CME que permite obtener mejores valores de crecimiento y viabilidad. En este caso se utilizó un test t simple pareado, con una confiabilidad del 99,95 %; seleccionando los valores de cada serie que corresponden a los máximos crecimientos. Este análisis se utilizó para comparar las curvas de crecimiento, teniendo en cuenta las diferentes fases o estadíos del cultivo. La Prueba de Múltiple Rangos se empleó para comparar las medias de las $K_{\text{máx}}$, t_g y μ de los cultivos experimentales.

Se utilizaron los programas Basic Statistics, Microsoft Office Excel 2008 y Origin 8.0 Pro, para los análisis estadísticos y la elaboración de los gráficos. Para la gestión bibliográfica se utilizó el Endnote X6.

Resultados y Discusión

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de 15 días de experimento y en varias réplicas, se tomaron muestras de los diferentes cultivos para determinar la evolución de parámetros específicos del crecimiento. Estos parámetros fueron la concentración celular, la tasa de crecimiento media y el tiempo de duplicación. Además se determinó el efecto del CME sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos; y se estableció su relación con el oxígeno producido por estos organismos, a través de la determinación de la tasa de oxígeno fotosintético. Finalmente, se realizó la experimentación para estudiar parámetros productivos de los cultivos expuestos al CME, en las diferentes fases del crecimiento que mejores resultados mostraron de los análisis anteriores.

3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CONTROLES DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK

La figura 3.1 muestra la cinética de crecimiento de la cepa local de *C. vulgaris* Beijerinck al ser cultivada en medio Bristol a pH 7 durante 15 días. La curva permite definir el modelo de crecimiento de la cepa en estudio, el cual responde a un ajuste polinomial de orden 5 ($R^2=0,995$). La fase de latencia o fase “Lag”, tuvo una duración corta (< 24 h), lo que indica que las células de *C. vulgaris* se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas y completamente adaptadas a las condiciones experimentales. A partir del segundo día de cultivo aumenta la concentración celular de forma exponencial hasta el día 5, momento a partir del cual los cultivos entran en fase de retardo hasta el día 11 de cultivo; la fase estacionaria tiene una corta duración y termina el día 13; ya el día 14 hay muerte celular. La máxima concentración celular se alcanza el día 12, con $5\,777,75 \pm 8$ cél. $\text{mL}^{-1} \times 10^4$.

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos (Hernández, 2003). Los resultados obtenidos en esta etapa sugieren *C. vulgaris* al mostrar un rápido crecimiento durante los primeros días de cultivo, las células se ven limitadas de luz, producto del aumento acelerado de la concentración celular.

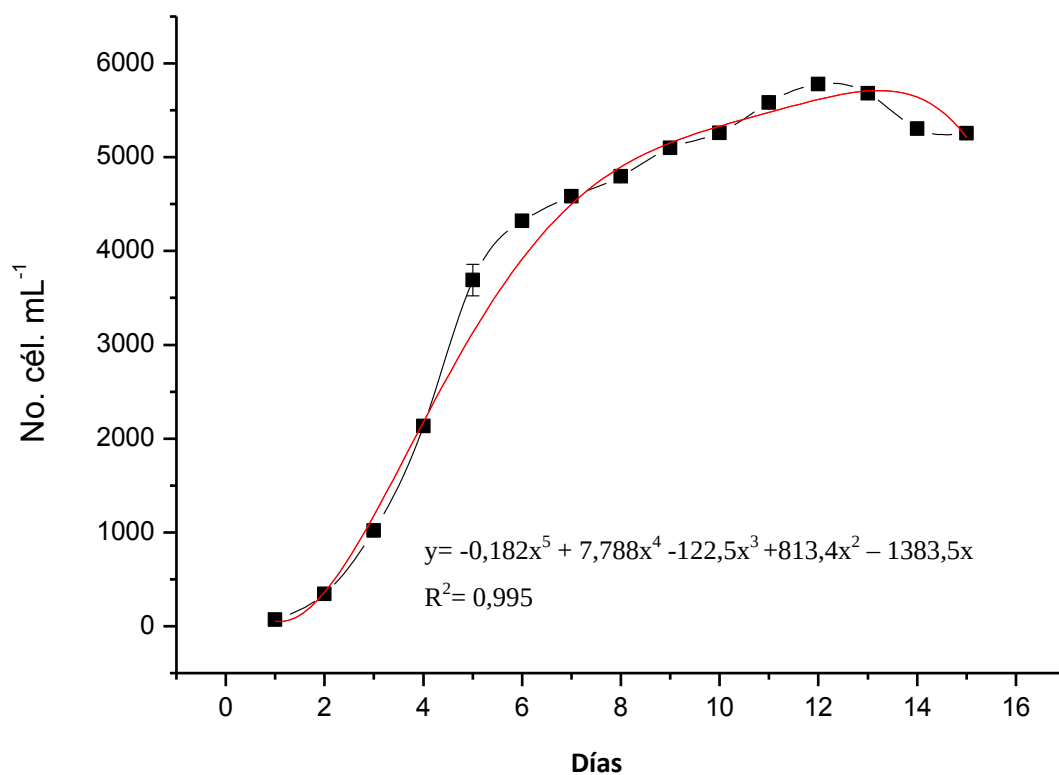


Figura 3.1. Cinética de crecimiento de cultivos control de *C. vulgaris* establecidos en medio Bristol a pH=7 e intensidad de la luz de 58,59 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE *C. VULGARIS* EXPUESTOS AL CME

Uno de los objetivos principales en experimentos de crecimiento de cultivos de microalgas es demostrar que un determinado tratamiento permitirá obtener mejores resultados que el procedimiento estándar. Para facilitar esta selección, se graficó la evolución en el tiempo de los cultivos de *C. vulgaris* expuestos a un CME de 47,23 mT con diferentes dosis de aplicación, en diferentes momentos del crecimiento exponencial (Figura 3.2).

Se hace evidente que la cinética de los controles es diferente a la de los cultivos expuestos al CME, observándose que los últimos mantienen un ritmo de crecimiento sostenido, y no se verifica su declinación durante los 15 días de cultivo. El crecimiento es una respuesta de los organismos a las condiciones del entorno y los efectos positivos o negativos, podrían indicar cómo las rutas biosintéticas pueden ser impulsadas producto del factor de estímulo, en este caso el CME. Según los resultados de esta experimentación, la aplicación de dosis repetidas de CME estimula el crecimiento de las microalgas a medida en que se aumenta la dosis, independientemente de la fase del crecimiento donde fue aplicado, con claras ventajas en su aplicación durante la fase exponencial temprana.

Algunas investigaciones han demostrado que la influencia del CME sobre los microorganismos depende de la inducción de campo magnético aplicado, así como del tiempo de exposición (Yang y cols., 2011; Tu y cols., 2015; Deamici y cols., 2016; Nezammahalleh y cols., 2016). Sin embargo, pocos explican la influencia del número de veces en que se aplica este agente físico, y su relación con el momento del crecimiento en donde es aplicado.

Los resultados de esta etapa de la investigación permiten definir que el CME no homogéneo de 47,23 mT, aplicado durante la fase exponencial temprana podría estar facilitando la absorción de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, en una etapa del crecimiento donde el microorganismo tiene mayores requerimientos nutricionales producto de los procesos metabólicos que se desencadenan para el crecimiento celular. Pudiera hablarse entonces de un efecto positivo del CME sobre el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*, en dependencia de la dosis aplicada y el momento de exposición al campo, lo que indica que la microalga responde a condiciones de perturbación extrema con un aumento de la tasa de crecimiento.

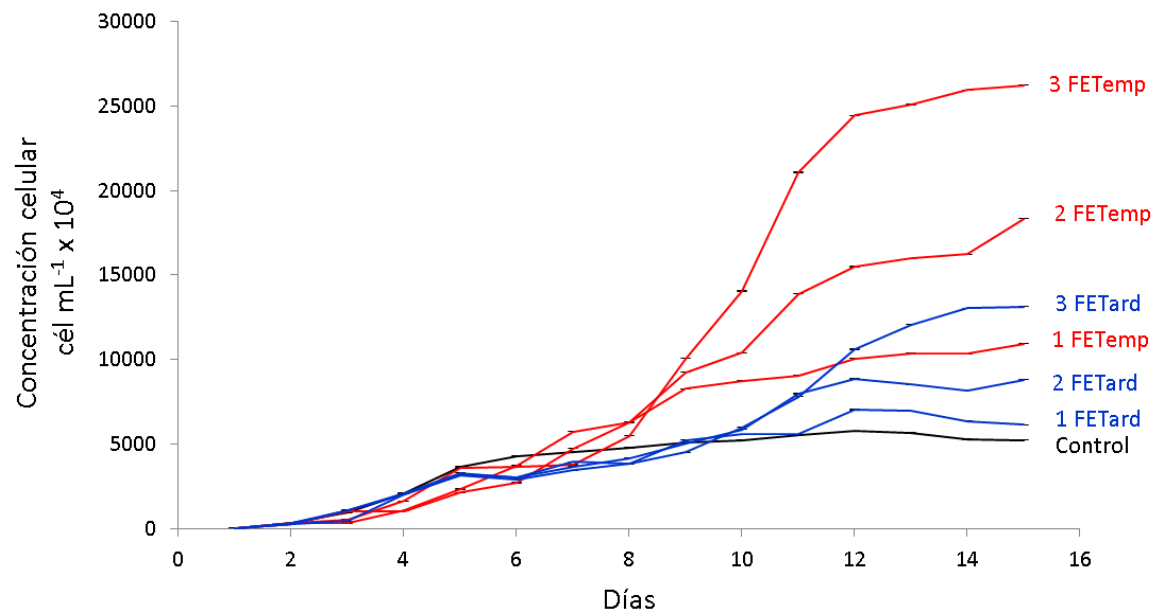


Figura 3.2. Cinética de crecimiento de cultivos de *C. vulgaris* expuestos a un CME de 47,23 mT, en fase exponencial temprana (FETemp) y tardía (FETard). Los números (1-3) indican número de dosis aplicadas.

Otro aspecto de gran importancia es el relacionado con las concentraciones celulares máximas ($K_{m\acute{a}x}$) de los cultivos, ya que este dato involucra la selección del momento más adecuado para la cosecha. La tabla 3.1 muestra el valor de la $K_{m\acute{a}x}$ para los cultivos y la figura 3.3, el incremento de la concentración máxima alcanzada en estos, respecto al control.

Los mayores valores de concentración celular máxima se obtuvieron en los cultivos expuestos al CME durante la fase exponencial temprana el día 15, siendo más significativos aquellos obtenidos con dos y tres repeticiones ($K_{m\acute{a}x}$: $18\ 333,88 \pm 5$ y $26\ 214,75 \pm 4 \times 10^4$ cél. mL⁻¹) ($p \leq 0,05$), respectivamente. Por otro lado los mayores incrementos fueron alcanzados en la fase exponencial temprana, siendo superiores los valores obtenidos con tres dosis ($p \leq 0,05$) (Figura 3.3).

En la figura 3.2 también se observa que los cultivos controles alcanzan su concentración máxima el día 12. Sin embargo, concentraciones similares a las obtenidas por estos cultivos se alcanzan el día siete en aquellos donde se aplicó una dosis de CME durante la fase exponencial temprana. Este resultado es de gran relevancia a nivel industrial, ya que se disminuye el tiempo de cultivo cinco días. Esto podría generar ahorros en el proceso tecnológico de producción *C. vulgaris*, relacionado con la obtención de metabolitos de interés en menor tiempo, con la disminución de electricidad y una mayor durabilidad del equipamiento producto de una menor explotación, entre otros.

Tabla 3.1. Concentración celular máxima alcanzada en cultivos de *C. vulgaris* expuestos a diferentes dosis de un CME de 47,23 mT en diferentes momentos de la fase de crecimiento exponencial y control (LSD, $p \leq 0,05$).

No. de dosis	Fase Exponencial Temprana ($\times 10^4$ cél. mL ⁻¹)	Fase Exponencial Tardía ($\times 10^4$ cél. mL ⁻¹)
1	10 962,75 $\pm$ 5 ^c	6 168,75 $\pm$ 7 ^b
2	18 333,88 $\pm$ 5 ^d	8 833,50 $\pm$ 9 ^b
3	26 214,75 $\pm$ 4 ^f	13 134,75 $\pm$ 9 ^c
Control	5 777,75 $\pm$ 8 ^a	

Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

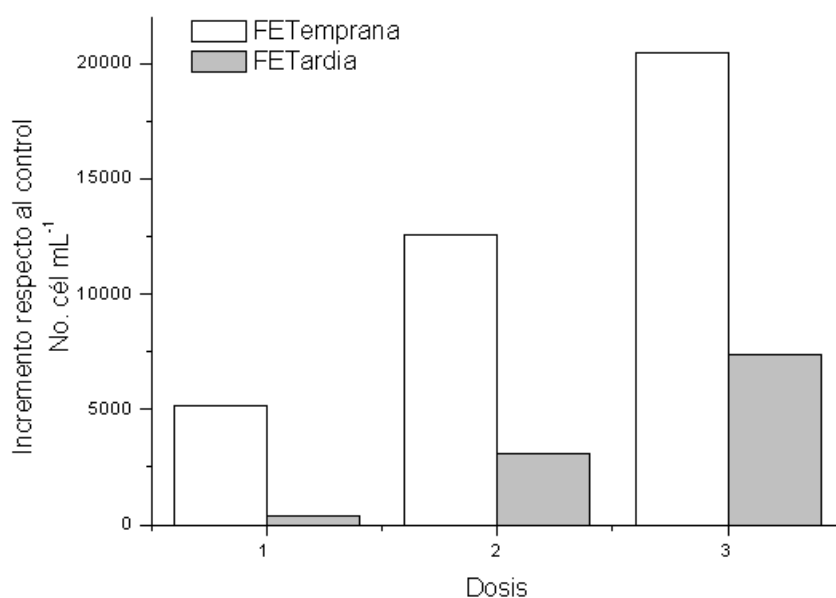


Figura 3.3. Incremento de la $K_{máx}$ respecto al control en cultivos de *C. vulgaris* expuestos a un CME de 47,23 mT en fase exponencial temprana (FETemp) y tardía (FETard) ($p \leq 0,05$).

3.3 VIABILIDAD DE CULTIVOS *C. VULGARIS* BEIJERINCK EXPUESTOS A UN CME EN DIFERENTES MOMENTOS DEL CRECIMIENTO

3.3.1 TASA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN

En la tabla 3.2 se muestran los resultados de μ y t_g de cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck expuestos a un CME de 47,23 mT en diferentes momentos del crecimiento, con el fin de evaluar los efectos de este agente físico sobre la viabilidad de los cultivos.

Tabla 3.2. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de cultivos *C. vulgaris* Beijerinck expuestos un CME de 47,23 mT en diferentes fases del crecimiento.

Dosis de aplicación de CME	$\mu(d^{-1})$	$t_g(d)$
Control	0,19±0,01 ^a	3,59±0,01 ^a
1 Dosis FETemp	0,25±0,02 ^b	2,78±0,02 ^b
2 Dosis FETemp	0,31±0,02 ^c	2,30±0,02 ^c
3 Dosis FETemp	0,35±0,2 ^d	1,98±0,02 ^d
1 Dosis FETard	0,22±0,01 ^e	3,12±0,01 ^e
2 Dosis FETard	0,23±0,04 ^e	2,98±0,04 ^e
3 Dosis FETard	0,25±0,03 ^b	2.76±0,03 ^b

Letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,05$). FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis y 3: tres dosis aplicadas.

Al evaluar los resultados obtenidos de los parámetros de crecimiento μ y t_g , puede observarse que existe influencia del CME sobre el crecimiento y viabilidad de los cultivos. En los cultivos expuestos al CME la tasa de crecimiento se incrementa significativamente, al aumentar la dosis ($p \leq 0,05$). Además, se corrobora que la aplicación de este agente físico, durante la fase exponencial temprana, es más efectiva sobre la viabilidad de los cultivos, que los expuestos durante la fase exponencial tardía.

Por otro lado, es interesante analizar lo que ocurre con el tiempo de duplicación, ya que este es un parámetro de crecimiento que representa el tiempo necesario para que se duplique la población de células. Este puede considerarse como un factor limitante para seleccionar el esquema de tratamiento magnético al que serán sometidos los microorganismos con el fin de obtener mayores concentraciones celulares en el menor tiempo posible. En este sentido, se observó que los cultivos expuestos a un CME de 47,23 mT, disminuyen significativamente su tiempo de duplicación respecto al control ($p \leq 0,05$), en función de la dosis aplicada y el momento de la fase de crecimiento donde se aplica; siendo menores aquellos donde se aplicaron tres dosis de CME durante la fase exponencial temprana.

Trabajos realizados por (Rodriguez-Garcia y cols., 2008; Briceño Valera, 2012) con microalgas marinas pertenecientes a la familia Chlamydomonadaceae con medios nutritivos específicos para microalgas marinas muestran tasas de crecimiento poblacional superiores a 0,20.

(Salomón y cols., 2005; Quevedo O y cols., 2008) evaluaron distintos medios de cultivo específicos para microalgas dulceacuícolas. Los valores obtenidos en $\text{Div} \cdot \text{d}^{-1}$ y t_g durante el estudio mostraron que las condiciones nutricionales limitan el potencial de crecimiento poblacional, de esta manera el tiempo que demora la población en duplicar su número es superior en comparación a un medio nutritivo específico.

Con estos resultados se comprueba el efecto positivo sobre la viabilidad de cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck expuesto a un CME no homogéneo de 47,23 mT. Pudiera decirse que el CME mejora el aprovechamiento de los nutrientes, principalmente cuando se aplica tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana del crecimiento. El hecho de que este agente físico mejore parámetros de crecimiento y viabilidad, lo convierte en una tecnología promisoría para el desarrollo de estos cultivos a escala comercial, ahorrando recursos y tiempo, lo que pudiera permitir un mejor manejo de los mismos a gran escala.

3.4 EFECTO DEL CME SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN CULTIVOS DENSOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK

En la figura 3.4 se muestra la variación de la concentración de OD, hasta el día 13, en cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck expuestos a un CME de 47,23 mT en diferentes momentos del crecimiento. En

todos los cultivos tratados, con este agente físico, se manifiesta un aumento significativo de la concentración de OD respecto a los cultivos controles ($p \leq 0,05$). Este incremento se observó a partir del día 10 para los cultivos expuestos durante la fase exponencial tardía. Sin embargo, en los cultivos expuestos durante la fase exponencial temprana este fenómeno se observa a partir del día cinco y con efecto más marcado. En este último grupo, los valores de concentración de OD fueron de: $4,01 \pm 0,13$; $4,02 \pm 0,09$ y $3,93 \pm 0,11$ mg L⁻¹, para los cultivos donde se aplicó una dosis, dos dosis y tres dosis de CME, respectivamente.

El OD es uno de los índices más importantes de la calidad del agua con el cual se puede evaluar el grado de purificación de este recurso. En circunstancias normales, la concentración de OD en el agua superficial varía entre 5 ~ 10 mg L⁻¹; cuando se alcanza el estado de saturación se puede decir que el agua no está contaminada (Tu y cols., 2015). La concentración de OD en el agua está estrechamente relacionada con la cantidad de microorganismos, la cantidad de materia orgánica, la temperatura del agua, la capa de agua y la salinidad (Yang y cols., 2011).

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación sugieren que el CME, aplicado durante la fase exponencial temprana, mejora la eficiencia de producción de oxígeno en las microalgas. La alta eficiencia en la producción de oxígeno está estrechamente relacionada con la eficiencia fotosintética de estos microorganismos. Este hallazgo pudiera ser utilizado para lograr la operación eficiente del sistema de depuración de aguas residuales con microalgas (Vijayaraghavan y cols., 2003).

El oxígeno disuelto en aguas ricas en nutrientes está controlado, principalmente, por la actividad metabólica de los microorganismos presentes. Por tanto, a medida que el número de algas aumenta en un cierto orden de magnitud, su número y sus actividades de vida deben controlar el cambio de oxígeno disuelto en el agua (Yang y cols., 2011). Un alto contenido de oxígeno disuelto es útil para la degradación de diversos contaminantes en el agua y así purificarla más rápidamente. Sin embargo, si el contenido de oxígeno disuelto es menor, los contaminantes en el agua se degradarán más lentamente (Fernández y cols., 2012).

A diferencia de la mayoría de plantas desarrolladas o superiores, la microalgas logran realizar la fotosíntesis en el agua, condición que puedan brindar ciertas particularidades, limitaciones y

características específicas al proceso (Ono y cols., 2007; Velea y cols., 2009). Entre las que se encuentran, la captación de CO₂ del medio (en este caso tipo acuoso) y su transformación está en la bases de la Rubisco, (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), la enzima clave envuelta en la fijación del carbono, representando uno de los factores más importantes, lo que determina finalmente las tasas de crecimiento microalgal (Ono y cols., 2007). El O₂ compite con el CO₂ por el sitio activo de la enzima, de manera que las tasas de carboxilación dependen de la concentración de CO₂ relativa a la de O₂ así como de la selectividad del enzima para el CO₂ frente al O₂. Altos valores del índice CO₂/O₂ suprimen la actividad oxigenasa de la Rubisco. Por el contrario, cuanto menor sea dicho índice, más limitada podría estar la fotosíntesis por el CO₂ (Ono y cols., 2007).

Los resultados obtenidos relacionados con la concentración de oxígeno disuelto sugieren que la aplicación del CME, durante la fase exponencial temprana, hace más eficiente la fijación de CO₂ por parte de la Rubisco. Esta hipótesis se sustenta sobre la base de que, durante la fase exponencial temprana no se ve afectada la concentración celular, lo cual pudiera ser un indicio de la eficiencia en el proceso fotosintético donde la asimilación del CO₂ por las microalgas juega un papel fundamental (Wilson y cols., 2017).

Si la concentración de *C. vulgaris* cambia por unidad de volumen de agua, el oxígeno disuelto en esta cambiará, como se ha visto, en función de la dosis de CME y la fase del crecimiento donde se aplique. Para los cultivos de microalgas en un recipiente sellado, la variación del oxígeno disuelto en el agua solo puede provenir de la fotosíntesis del microorganismo. *Chlorella* es un género de organismos fotoautótrofos que pueden convertir agua, CO₂ y sales de nutrientes inorgánicos en materia orgánica requerida por su metabolismo, mediante la absorción de energía luminosa y la emisión de oxígeno (Yang y cols., 2011). La ecuación 3.1 representa el proceso de reacción de fotosíntesis de las microalgas.



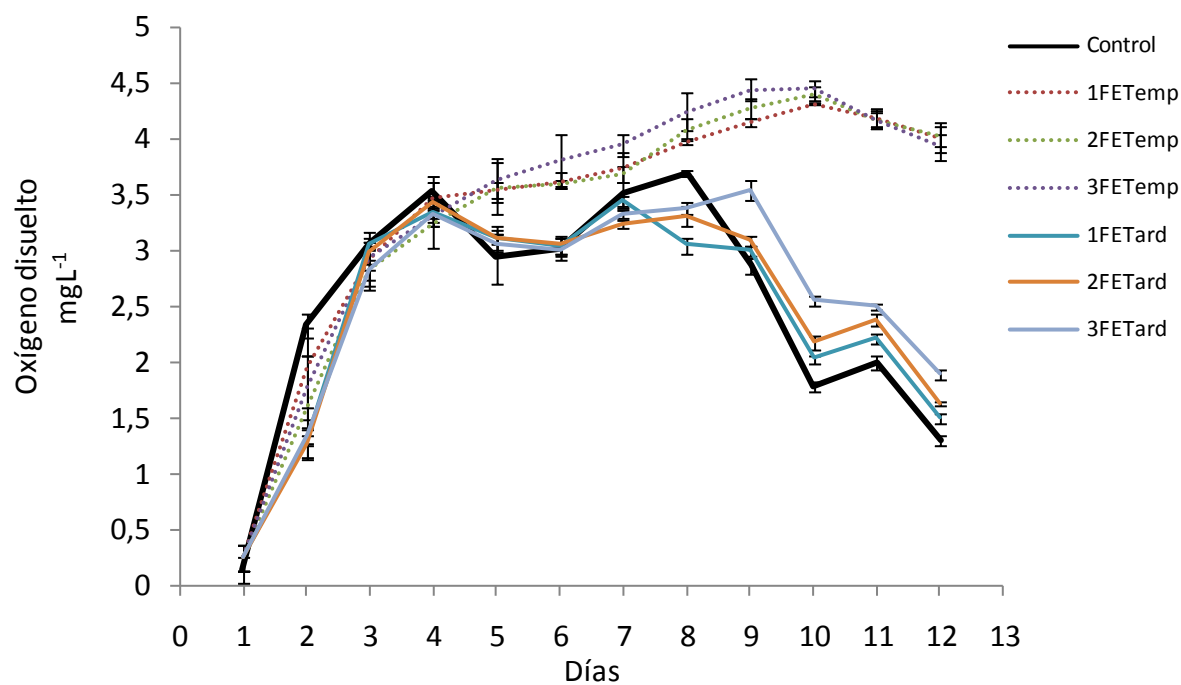


Figura 3.4. Variación de la concentración de oxígeno disuelto en cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck expuestos al CME. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis y 3: tres dosis aplicadas.

Muchos estudios han confirmado que factores ambientales como la calidad, intensidad y frecuencia de la luz (Chen y cols., 2011; Hancke y cols., 2014; Pires y cols., 2014; Tamburic y cols., 2014) y el pH (Wang y cols., 2008; Ying y cols., 2014) pueden influir en la eficiencia de producción de oxígeno de algas. Sin embargo, el efecto del CME aplicado en diferentes momentos del crecimiento con diferentes dosis, aún no se ha estudiado a profundidad.

3.4.2 TASA DE EVOLUCIÓN DE OXÍGENO FOTOSINTÉTICO DE CULTIVOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK EXPUESTOS A UN CME EN DIFERENTES FASES DEL CRECIMIENTO

La figura 3.5 muestra el comportamiento de la tasa de evolución de oxígeno fotosintético en función de las dosis de aplicación del CME y las fases del crecimiento donde se aplica. En la figura 3.5A se observa que el POER de los cultivos expuestos al CME, durante la fase exponencial temprana, disminuye cuando se aplica una sola dosis de campo, para luego aumentar con el incremento de la dosis. Este resultado pudiera indicar, que los cultivos expuestos con dos y tres dosis de CME, mejoran la eficiencia de captación de la luz que necesitan para la fotosíntesis.

Para los cultivos expuestos durante la fase exponencial tardía (Figura 3.5B) se observó un incremento del POER, cuando se aplican una y dos dosis de CME. Sin embargo, al aplicar tres dosis durante esta fase del crecimiento, este parámetro disminuye notablemente. Este hallazgo señala, que el estrés generado por la aplicación de tres dosis de CME en la fase exponencial tardía, ejerce una influencia negativa sobre la tasa de producción de oxígeno fotosintético de estos microorganismos.

Resultados similares fueron obtenidos por Tu y colaboradores (Tu y cols., 2015), quienes evaluaron el efecto del CME sobre la concentración de OD y de la POER en *Scenedesmus obliquus*. Estos investigadores observaron que con la aplicación del CME en todos los esquemas evaluados, aumentaba la concentración de OD, en comparación con los cultivos controles. Además, comprobaron que durante el período de cultivo temprano, se obtenían las mayores concentraciones de OD y de la POER.

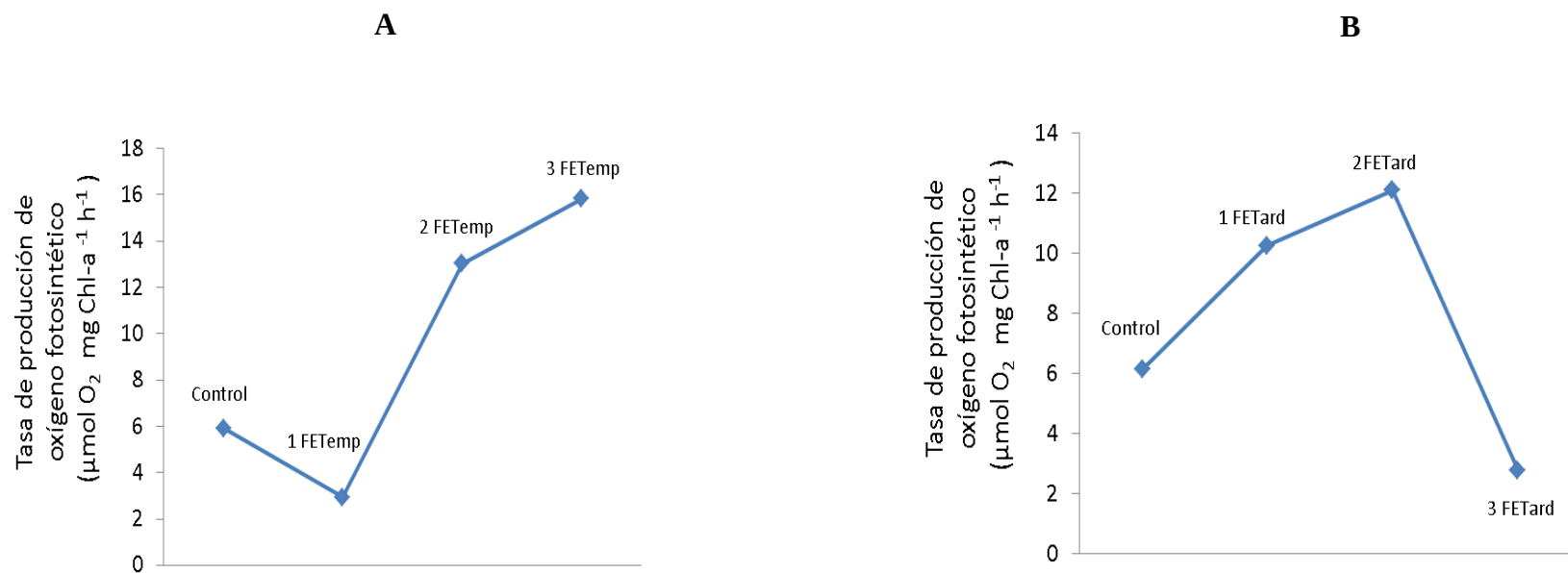


Figura 3.5. Tasa de producción de oxígeno fotosintético de cultivos de *C. vulgaris* expuestos al CME. (A) fase exponencial temprana, calculada para el día 7 del cultivo. (B) fase exponencial tardía, calculada para el día 11. FETemp: fase exponencial temprana. FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis aplicadas durante una hora en dos días consecutivos, 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

En el tratamiento de aguas residuales, las condiciones aeróbicas a menudo se aplican para la biodegradación de contaminantes orgánicos. Tradicionalmente, el oxígeno se introduce por difusión de aire o aireación superficial con mayores costos de operación, consumiendo aproximadamente $0,5 \text{ kWh m}^{-3}$ de aguas residuales tratadas y provocando un riesgo de volatilización de contaminantes orgánicos peligrosos. La fotosíntesis de microalgas, potenciada por la acción de un CME, pudiera proporcionar una alternativa para superar las limitaciones de la aireación mecánica convencional, debido al incremento de oxígeno disuelto y la tasa de producción de oxígeno fotosintético que se produce cuando se aplican dosis repetidas en la fase exponencial temprana de crecimiento.

3.4.3 TASA DE PRODUCCIÓN DE OXÍGENO DE CULTIVOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK EXPUESTOS A UN CME EN DIFERENTES FASES DEL CRECIMIENTO

En la figura 3.6 se muestra el comportamiento de la tasa de producción de oxígeno en los cultivos de *C. vulgaris*. Los cultivos expuestos al CME durante la fase exponencial temprana, incrementan su tasa de producción de oxígeno en relación a los cultivos control y a los expuestos durante la fase exponencial tardía. Este incremento se observó a partir del séptimo día de cultivo.

Este resultado confirma lo obtenido por Tu y colaboradores (Tu y cols., 2015), en relación a la tasa de producción de oxígeno en *Scenedesmus obliquus*. Ellos observaron que el mejor esquema de aplicación del CME es durante la fase exponencial (sin especificar la etapa de dicha fase), cuando se aumenta el tiempo de exposición de los cultivos.

De forma general, los esquemas de CME empleados en esta tesis aumentan la tasa de producción de oxígeno durante la fase exponencial temprana. Este hecho, sugiere que esta tecnología pudiera ser utilizada en el proceso de depuración de agua, con el valor añadido de la obtención de otros productos de interés industrial.

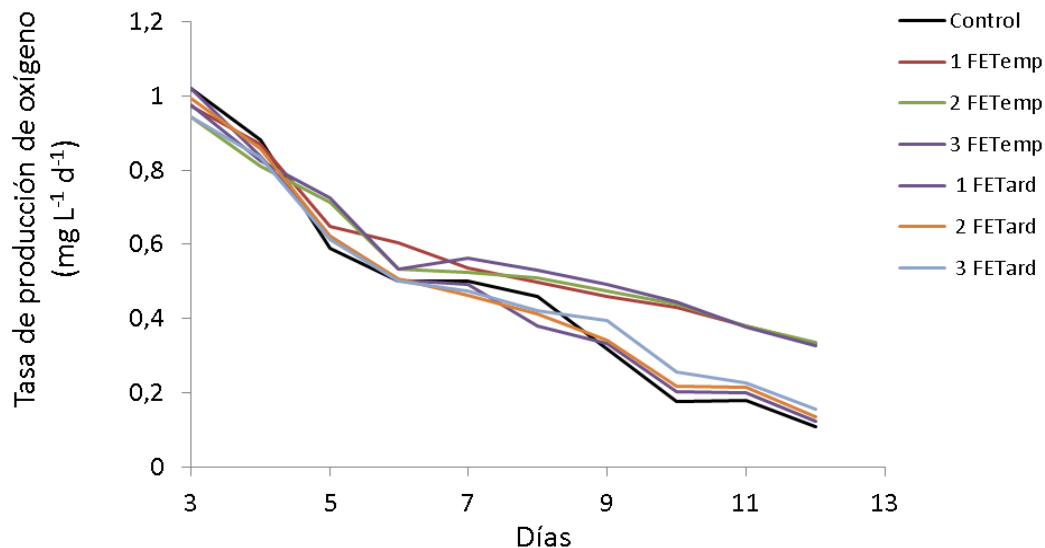


Figura 3.6. Tasa de producción de oxígeno en cultivos de *C. vulgaris* expuestos al CME. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis aplicadas durante una hora en dos días consecutivos, 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

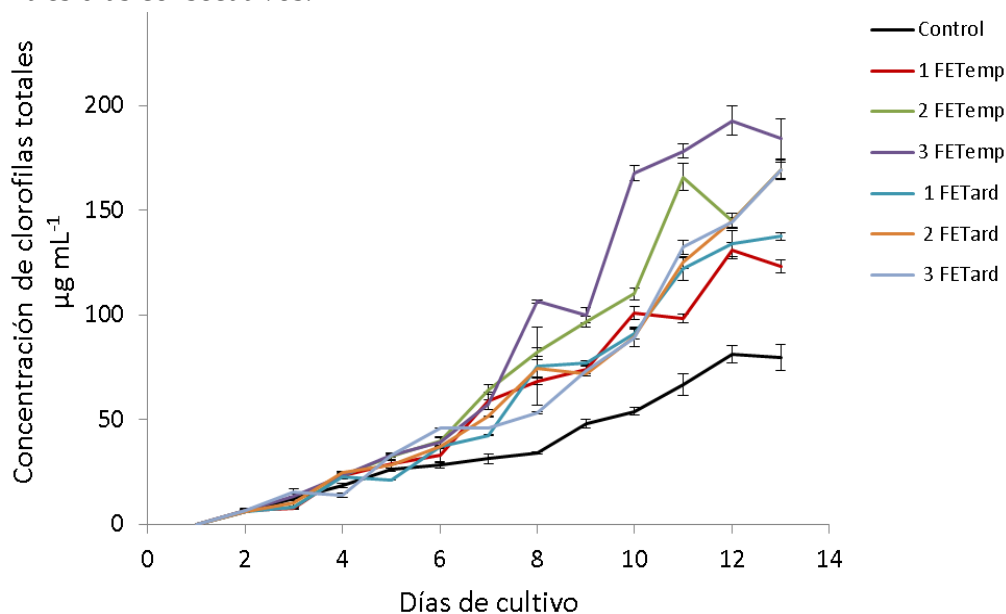


Figura 3.7. Variación de la concentración de clorofilas totales en cultivos de *C. vulgaris* expuestos al CME. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis aplicadas durante una hora en dos días consecutivos, 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

3.5 EFECTO DEL CME SOBRE LA CONCENTRACIÓN PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN CULTIVOS DENSOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK

La figura 3.7 presenta la evolución en el tiempo de la concentración de clorofilas totales de *C. vulgaris* Beijerinck expuestas a diferentes dosis de CME, en diferentes momentos del crecimiento. Durante los primeros seis días de crecimiento, en todos los cultivos se observó el mismo comportamiento de la concentración de clorofilas totales, es decir, aumenta en medida del incremento de la concentración celular. A partir del séptimo día, en los cultivos expuestos al CME se incrementan significativamente las concentraciones de este parámetro, respecto al cultivo control ($p \leq 0,05$). Se observan diferencias significativas entre los cultivos donde se aplican tres dosis durante la fase exponencial temprana y el resto de los cultivos tratados ($p \leq 0,05$). La concentración máxima de clorofilas totales ($192,73 \pm 6,89 \mu\text{g ml}^{-1}$), se alcanzó al día 12 de cultivo en aquellos donde se aplicaron tres dosis de CME durante la fase exponencial temprana.

El contenido de clorofila total es considerado un índice de productividad biológica ya que permite cuantificar el crecimiento de un organismo fotoautótrofo (Ibáñez y cols., 2006; Gouveia y cols., 2014), estudiaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila en *Dunaliella salina*, ellos informaron que el contenido de clorofila total se correlaciona positivamente con la densidad o biomasa celular.

Estudios realizados por diferentes autores (Masojidek y cols., 2004; Melis y cols., 2007; Benavente-Valdés y cols., 2016) indican que la concentración de clorofilas está estrechamente relacionada con la asimilación del nitrógeno inorgánico presente en el medio, ya que este elemento resulta esencial en la estructura de estos componentes celulares, los cuales son responsables primarios de la fotosíntesis. Las clorofilas permiten obtener información sobre el crecimiento y la capacidad fotosintética de las microalgas. Además, el incremento del contenido de clorofila celular, influye en la eficiencia de los complejos proteicos colectores de luz, lo que genera un aumento de la capacidad fotoquímica. Por lo visto anteriormente, el CME aplicado en diferentes momentos del crecimiento y con diferentes dosis, pudiera incidir en la asimilación de nitrógeno inorgánico presente en el medio de cultivo. Esto pudiera contribuir a un incremento de la obtención de energía (ATP) utilizable en respiración a nivel celular para la síntesis de macromoléculas (carbohidratos, proteínas, lípidos,

entre otros) y en último término, para llevar a cabo el crecimiento (Masojidek y cols., 2004; Mussnug y cols., 2010), lo cual se ha evidenciado durante estos experimentos.

Estudios realizados por diferentes autores muestran que el contenido de pigmentos fotosintéticos, específicamente clorofila *a*, es inversamente proporcional a la intensidad lumínica del cultivo, es decir, que a mayor intensidad lumínica menor es el contenido de clorofilas en las células. Se ha observado que la radiación PAR permanece constante durante quince días de cultivo, por lo que las variaciones de luminosidad del cultivo son atribuibles al crecimiento sostenido de las células en las que presumiblemente, se habría generado un “auto-sombreamiento” (Gouveia y cols., 2014). Resultados similares se obtuvieron en esta tesis, lo cual es otra evidencia de la posible limitación de luz de los cultivos, producto de un aumento acelerado de la concentración celular.

En este trabajo se evaluó además, la concentración máxima de clorofilas totales y carotenoides producidos por *C. vulgaris* Beijerinck en función de la dosis de CME en diferentes momentos del crecimiento (Figura 3.8). En esta figura se observa un incremento de carotenoides y clorofilas totales para los cultivos expuestos al CME, respecto al control. Este incremento, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$), está en correspondencia con el aumento de la concentración celular de los cultivos expuestos al CME.

La relación entre los pigmentos ha sido utilizada por varios autores para definir el estado de cultivos (Gomez Luna y cols., 2011), y se ha relacionado con una mejor absorción de nutrientes (Gonzalez y cols., 2016) específicamente de nitrógeno (Gómez y cols., 2009) para el caso de la estimulación de la clorofila.

En las microalgas los carotenoides pueden encontrarse en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en el interior de cuerpos lipídicos. Actúan como pigmentos accesorios que capturan la energía de la luz entre 400 y 500 nm, no absorbida eficientemente por la clorofila, canalizándola hasta este último pigmento. Por otro lado, desarrollan una función de fotoprotección, previniendo la fotooxidación, ya que atenúan o desenergizan especies reactivas de oxígeno, así como la clorofila en estado excitado.

.

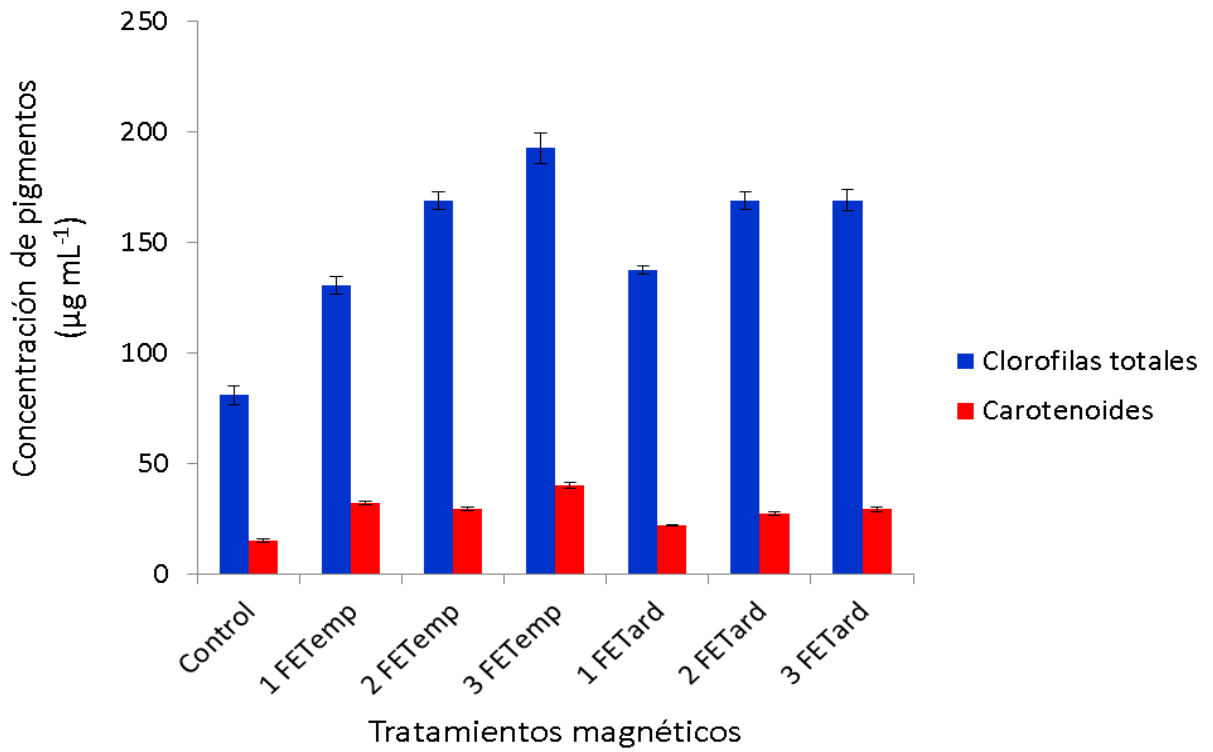


Figura 3.8. Concentración de clorofilas totales y carotenoides de cultivos de *C. vulgaris* expuestos al CME. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 1: dosis única, 2: dos dosis aplicadas durante una hora en dos días consecutivos, 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

Estos efectos observados demuestran que *C. vulgaris*, normalmente, acumula más clorofila que carotenoides. Al aplicar el CME durante la fase exponencial, se estimula la acumulación clorofilas totales y carotenoides respecto a los cultivos controles, siendo significativamente superiores en los cultivos expuestos durante la fase exponencial temprana. Este resultado, pudiera constituir una evidencia de una respuesta al estímulo producido por la aplicación de un CME de 47,23 mT^{3.6}

CONCENTRACIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DE CULTIVOS DENSOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK EXPUESTOS AL CME

La figura 3.9 muestra el comportamiento de la concentración y la productividad de la biomasa de cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck, expuestos a un CME de 47,23 mT con tres dosis repetidas, en diferentes momentos del crecimiento. En este sentido, se representaron las concentraciones y la productividad de la biomasa de los cultivos donde se obtuvieron los mejores valores de parámetros de crecimiento (tres dosis de aplicación del CME durante las fases exponencial temprana y tardía). Se observó que los valores de la concentración (Figura 3.9A) y la productividad (Figura 3.9B) de la biomasa de cultivos expuestos al CME, son significativamente mayores que las del grupo control ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, entre los cultivos expuestos al CME no se observaron diferencias significativas. A pesar de esto, los resultados previamente analizados en los acápites 3.1–3.5 sugieren que la aplicación de tres dosis de CME durante la fase exponencial temprana es más efectiva para lograr un aumento de la eficiencia en los diferentes procesos metabólicos que ocurren en estos microorganismos.

Como se menciona anteriormente, la biomasa de microalgas posee numerosas aplicaciones. En la actualidad se investiga y desarrolla la tecnología aplicada a la biomasa en función de aumentar el rendimiento energético de este recurso, minimizar los efectos negativos ambientales de los residuos producto de las aplicaciones y aumentar la competitividad en el mercado de los productos.

problemas de ingeniería que necesitan ser resueltos para poder desarrollar sistemas eficientes, a gran escala y de bajo costo (Pruvost y cols., 2016).

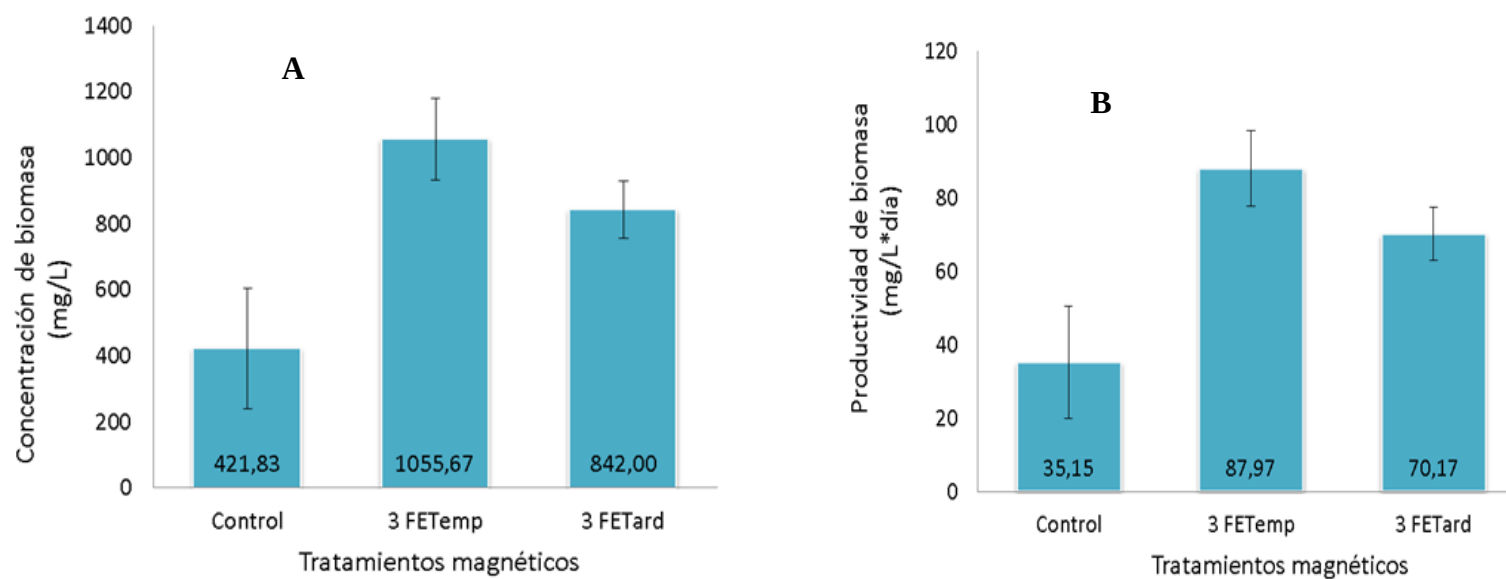


Figura 3.9. Concentración (A) y productividad (B) de biomasa de cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck expuestos a un CME de 47,23 mT con 3 dosis de repetición, en diferentes momentos del crecimiento. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

A pesar de la gran utilidad que tienen las microalgas como fuente de compuestos de alto valor agregado, aún son muchos los factores que limitan el desarrollo de esta área de la Biotecnología (Enzing y cols., 2014; Salama y cols., 2017; Ación y cols., 2018). Un factor limitante en este progreso ha sido la poca eficiencia de técnicas de cultivo a gran escala. Sus requerimientos han llevado a poner énfasis en el desarrollo de fotobiorreactores, en los que aún existen muchos problemas de ingeniería que necesitan ser resueltos para poder desarrollar sistemas eficientes, a gran escala y de bajo costo (Pruvost y cols., 2016).

Los criterios comunes de diseño de un fotobiorreactor son aquellos que conllevan una alta productividad volumétrica y de conversión de energía lumínica de forma económicamente viable (Moreno-García y cols., 2017). En este sentido, los resultados de esta investigación sugieren que la integración de la tecnología de aplicación del CME (en el momento adecuado del crecimiento de los microorganismos) con el desarrollo de fotobiorreactores, pudiera incrementar la productividad de biomasa en los cultivos de *C. vulgaris* Beijerinck.

Otro aspecto importante que limita el desarrollo de la biotecnología de microalgas, es la rentabilidad del metabolito de interés industrial que se desea obtener; ya que una alta productividad de biomasa no implica necesariamente altas concentraciones del metabolito deseado. Es por ello que la fórmula para el éxito en la industria biotecnológica es obtener el mejor resultado posible del producto de dos factores: la productividad de la biomasa y la concentración del metabolito de interés.

La figura 3.10 muestra la variación de la productividad de biomasa y la concentración de carotenoides de los cultivos donde se obtuvieron los mejores valores de parámetros de crecimiento (tres dosis de aplicación del CME durante las fases exponencial temprana y tardía). Los mejores valores de concentración de productividad de biomasa y carotenoides se obtienen cuando se aplica el CME durante una hora de exposición, repetida cada 24h durante tres días, a partir del 3er día de cultivo (fase exponencial temprana).

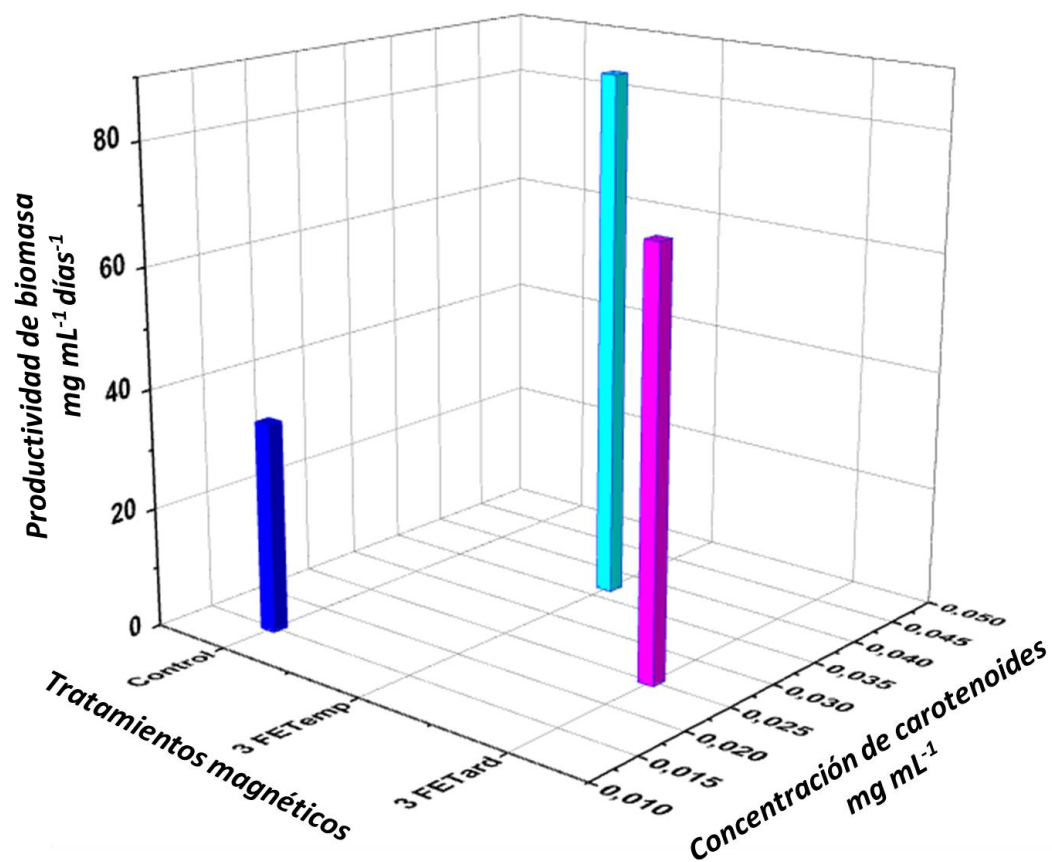


Figura 3.10. Variación de la productividad de biomasa y la concentración de carotenoides en función del esquema de CME aplicado. FETemp: fase exponencial temprana, FETard: fase exponencial tardía. 3: tres dosis aplicadas durante una hora en tres días consecutivos.

De los más de 400 tipos de pigmentos carotenoides, solo unos pocos son comercializados: β -caroteno, astaxantina y, en menor importancia, luteína, zeaxantina y bixina (Fiedor y cols., 2014). La mayoría de los carotenoides utilizados comercialmente se obtienen mediante síntesis química. Los seis carotenoides sintéticos de importancia comercial son: β -apocarotenal, éster etílico del ácido β -apo-8'-carotenoico, citranaxantina, β -caroteno, cantaxantina y astaxantina. Los precios en el mercado actual para polvos que contienen 5-10 % de carotenoide son: para el β -caroteno 600 \$ USA kg^{-1} ; para los apocarotenoides 900 \$; para la cantaxantina 1 300 \$ y para la astaxantina 2 500 \$ (Acién y cols., 2018). El incremento en el uso comercial de carotenoides naturales durante los últimos años se debe a las regulaciones, cada vez más restrictivas, sobre el uso de aditivos sintéticos en la industria alimentaria (Gong y cols., 2016).

Los resultados alcanzados en esta tesis son prometedores para la obtención de metabolitos de gran interés industrial como son los carotenoides, utilizando la tecnología del CME que potencia la obtención de biomasa para diferentes fines, sin producir daños ambientales.

3.7 CONSIDERACIONES GENERALES DE LOS EFECTOS DEL CME EN CULTIVOS DENSOS DE UNA CEPA LOCAL DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK

En los ecosistemas acuáticos tropicales, específicamente en Cuba, *Chlorella* es un género abundante y ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigación (Gómez, 1997; Gómez y cols., 2007; Gomez Luna y cols., 2011; Montero-Sánchez y cols., 2013; Montero-Sánchez y cols., 2013). En el CNEA, la especie ha sido utilizada como modelo biológico para los estudios sobre los efectos del CME en rangos entre 30-75 mT. En estos estudios se han desarrollado esquemas de aplicación única, demostrándose que el efecto del CME depende del tiempo y fase de exposición (Gómez y cols., 2007). Asimismo, se explica que la exposición por 1h durante la fase exponencial permite el crecimiento máximo, respecto a otros protocolos (Gomez Luna y cols., 2011).

En esta tesis se demuestra que el CME de 47,23 mT estimula el crecimiento de *C. vulgaris* Beijerinck, siendo diferentes la respuesta para cada uno de los esquemas de aplicación ensayados. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Yang, 2011; Tu y cols., 2015; Deamici y cols., 2016; Deamici y cols., 2016).

Por todo lo antes expuesto se confirma la hipótesis de que el efecto del CME sobre los sistemas biológicos tiene alta dependencia del momento y la dosis que se aplica. Al parecer, durante los primeros días de la fase exponencial *C. vulgaris Beijerinck* es más susceptible a variaciones metabólicas permanentes. Los mecanismos por los cuales los campos magnéticos afectan o estimulan el desarrollo de sistemas biológicos aún no están completamente dilucidados. Algunas hipótesis describen sus efectos sobre la permeabilidad de las membranas y la acción directa sobre partículas coloidales en el medio de cultivo, con repercusiones metabólicas (Dini y cols., 2005; Wang y cols., 2008; Yang y cols., 2011; Tu y cols., 2015). A pesar de que aún no quedan totalmente claros estos mecanismos, pudiera hablarse de una rápida adaptación de las microalgas a este agente físico.

Una de las consecuencias de la evolución es la adaptación, gracias a la cual una determinada especie se adecúa mejor a su hábitat y, como consecuencia de ello, tanto la estructura como el funcionamiento de un organismo lo hacen más adecuado para sobrevivir en un entorno específico. En este escenario de cambio global debido, principalmente, a la presión antropogénica sobre los ecosistemas, los organismos se ven en la necesidad de adaptarse al cambio constante de su hábitat natural. Gracias a tres mecanismos diferentes los organismos pueden sobrevivir en condiciones “estresantes”, dentro de unos límites. En primer lugar, la plasticidad fenotípica es la que determina la supervivencia (Charmantier y cols., 2008) gracias a un fenómeno denominado aclimatación o adaptación fisiológica. En un segundo nivel, una vez superados los niveles de plasticidad fenotípica se producirán cambios en la composición de las especies; según los cuales las especies mejor adaptadas a las nuevas condiciones incrementarán su abundancia desplazando a las más pobremente adaptadas (Ackerly, 2003; Urban y cols., 2011). Finalmente, cuando las condiciones ambientales superan los límites de la adaptación fisiológica, la supervivencia depende exclusivamente de la adaptación genética mediante la selección de nuevos genotipos que confieran resistencia través de la mutación, la transferencia horizontal de genes o recombinación (Sniegowski, 2005; Litchman y cols., 2012). En el caso particular de las microalgas, tienen poblaciones naturales con características biológicas tan especiales, que le permite esa flexibilidad adaptativa ante situaciones ambientales “estresantes”. Esto último se hace evidente al observar el comportamiento de *C. vulgaris Beijerinck*, al ser expuesta a un CME de 47,23 mT, durante diferentes momentos de la fase exponencial del crecimiento.

La tecnología magnética tiene como ventajas bajo costo de funcionamiento, no tiene efectos tóxicos comprobado, no producen contaminación secundaria, proporciona un amplio rango de aplicación y posee un tiempo de vida útil prolongado. La posibilidad de explotar comercialmente todo el potencial de productos derivados de microalgas (biorrefinería) puede hacer económicamente factible su escalado (Pires et al., 2012). En cultivos a gran escala podría hablarse no solo de eficiencia fotosintética, sino también de eficiencia de la asimilación de nutrientes, unido a la eficiencia de producción de oxígeno, condicionado por el CME.

Como tendencia general, en los cultivos expuestos durante la fase exponencial temprana mejoran los parámetros de crecimiento y viabilidad. Además, aumentan los valores de concentración de oxígeno disuelto, concentración de pigmentos (clorofilas y carotenoides); así como la productividad de biomasa. Todo esto se logra al parecer, mediante una adaptación de los microorganismos inducida por la acción del CME. Estos resultados permiten proponer el esquema de tratamiento con CME en tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana como una vía para mejorar la eficiencia del manejo de cultivos de *C. vulgaris* con potencialidades de uso para diferentes fines.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El CME no homogéneo de 47,23 mT aplicado en diferentes dosis durante la fase exponencial temprana y la fase exponencial tardía modifica el crecimiento y la viabilidad de *C. vulgaris*, dependiendo del momento y la forma en que se aplica, siendo la aplicación de tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana la que permite mejores valores de concentración celular.
2. La concentración de oxígeno disuelto en cultivos de *C. vulgaris* se incrementa cuando se aplica un campo CME no homogéneo de 47,23 mT; observándose que con el esquema de tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana se obtienen las mayores concentraciones de oxígeno disuelto, aumenta la tasa de evolución de oxígeno fotosintético y la tasa de producción de oxígeno.
3. El CME no homogéneo de 47,23 mT aplicado en diferentes momentos del crecimiento estimula la síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) de *C. vulgaris*, siendo el mejor esquema, cuando se aplica tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana.
4. Con la aplicación de un CME no homogéneo de 47,23 mT, se favorece la productividad de biomasa de *C. vulgaris*, independientemente de la fase del crecimiento donde se aplique el CME; siendo el mejor esquema cuando se aplica tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio del efecto del CME en la cinética de crecimiento del cultivo de *C. vulgaris* con el fin de identificar todas las fases del crecimiento.
2. Evaluar el efecto del CME sobre la concentración de nutrientes y el pH en el medio de cultivo empleado, para dilucidar los efectos de este agente, sobre la solubilidad de los nutrientes y su asimilación por los microorganismos.
3. Evaluar la productividad de lípidos, carbohidratos y proteínas aplicando el mejor esquema de CME no homogéneo de 47,23 mT (tres dosis repetidas durante la fase exponencial temprana), con el fin de determinar su posible aplicabilidad en el desarrollo de las “biorrefinerías”.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde J, Cid A, Fidalgo P, Torres E y Herrero C. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Monografía 26. 1995
- Acién F, Molina E, Fernández-Sevilla J, Barbosa M, Gouveia L, Sepúlveda C y cols. Economics of microalgae production. En: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts, pp. 485-503. Elsevier. 2018
- Ackerly DD. Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. International Journal of Plant Sciences 164: (S3) S165-S184. 2003
- Ale MT, Pinelo M y Meyer AS. Assessing Effects and interactions among key variables affecting the growth of mixotrophic microalgae: pH, inoculum volume, and growth medium composition. Preparative Biochemistry and Biotechnology 44: (3) 242-256. 2014
- Anaya M, Bárbara, E., Padrón, J., Borrego, S.F., Valdés, O., Molina, A. Influencia del campo magnético sobre el crecimiento de microorganismos patógenos ambientales aislados en el Archivo Nacional de la República de Cuba. 35: 325-336. 2015
- Arias Peñaranda MTMR, Alfredo de Jesús Cañizares Villanueva, Rosa Olivia. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biológica Colombiana 18: (1) 43-68. 2013
- Bartley ML, Boeing WJ, Dungan BN, Holguin FO y Schaub T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. Journal of applied phycology 26: (3) 1431-1437. 2014
- Becker EW. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. pp. 1994
- Benavente-Valdés JR, Aguilar C, Contreras-Esquivel JC, Méndez-Zavala A y Montañez J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. Biotechnology Reports 10: 117-125. 2016

- Borowitzka MA. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of applied phycology* 25: (3) 743-756. 2013
- Borowitzka MA. Energy from microalgae: a short history. En: *Algae for biofuels and energy*, pp. 1-15. Springer. 2013
- Briceño Valera JL. Crecimiento poblacional y contenido lipídico de *Tetraselmis suecica* con un medio nutritivo en base a residuos de pescado”. 2012
- Cáceres Aravena SO. Aislamiento y Caracterización de las Principales Microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante. 2009
- Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z y Tekinay T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 109: (8) 1947-1957. 2012
- Cardias BB, Deamici, B.C., Do Santos, L.O., Da Costa, J.A.V. Valiação dos efeitos da aplicação de campos magnéticos no crescimento da microalga *Spirulina*. 2014
- Cardol P, Forti G y Finazzi G. Regulation of electron transport in microalgae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807: (8) 912-918. 2011
- Cubero RG. Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética DE CO₂. pp. Universidad de Sevilla. 2013
- Chandra R, Rohit M, Swamy Y y Mohan SV. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource technology* 165: 279-287. 2014
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, Perrins C, Kruuk LE y Sheldon BC. Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science* 320: (5877) 800-803. 2008

- Chen X, Goh QY, Tan W, Hossain I, Chen WN y Lau R. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource technology* 102: (10) 6005-6012. 2011
- D'Alessandro EB y Antoniosi Filho NR. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58: 832-841. 2016
- Deamici KM, Costa JAV y Santos LO. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*. 2016
- Deamici KM, Cardias BB, Costa JAV y Santos LO. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochemistry* 51: (7) 912-916. 2016
- Del Campo JA, García-González M y Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* 74: (6) 1163-1174. 2007
- Deng G, Li Y, Hu H, Qi Y, Geng Y y Li Z. Effects of temperature, light and pH on photosynthesis, and of light--dark cycle on growth rate and biomass of *Scrippsiella trochoidea* and *Alexandrium tamarense*. *Wuhan botanical research* 22: (2) 129-135. 2004
- Depei W, Dewei G, Zhiyin P y Shujuan Y. Primary study of zarrouek-media treated by special magnetic field on production of polysaccharide of *Spirulina platensis* *Microbiology* 1: 004. 1998
- Deswarte F. Introduction to chemicals from biomass. John Wiley & Sons. pp. 2015
- Dini L y Abbro L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 36: (3) 195-217. 2005
- Enzing C, Ploeg M, Barbosa M y Sijtsma L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. IPTS Institute for Prospective technological Studies, JRC, Seville. 2014

- Fernández FGA, González-López C, Sevilla JF y Grima EM. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? Applied microbiology and biotechnology 96: (3) 577-586. 2012
- Fidalgo P. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Vol. Doctorado pp. 185. Universidade da Coruña, La Coruña, España. 1995
- Fiedor J y Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients 6: (2) 466-488. 2014
- Francavilla M, Colaianna M, Zotti M, G Morgese M, Trotta P, Tucci P y cols. Extraction, characterization and in vivo neuromodulatory activity of phytosterols from microalga *Dunaliella tertiolecta*. Current medicinal chemistry 19: (18) 3058-3067. 2012
- Fuse H. Effect of magnetism on growth of *Dunaliella salina*. 1992
- Gómez L. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Vol. Doctorado pp. 265. Universidad de La Coruña, La Coruña. <http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/5592>. 1997
- Gómez L, Pérez García N, García Rodríguez JL y Willson J. Cultivo acelerado de microalgas con el uso de un CM estático. pp. Santiago de Cuba. www.cnea.uo.edu.cu/2007/bioelec/r_ecotox.pdf. 2007
- Gómez L, Menéndez J, Álvarez I y Flores I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. Biotecnología Vegetal 9: (2) 105-117. 2009
- Gomez Luna L, Rivero RD y Inaudis Á. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. Revista Colombiana de Biotecnología XIII: (2) 27-38. 2011
- Gong M y Bassi A. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. Biotechnology advances 34: (8) 1396-1412. 2016

- Gonzalez-Bashan LE, Lebsky VK, Hernandez JP, Bustillos JJ y Bashan Y. Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. Canadian journal of microbiology 46: (7) 653-659. 2000
- Gonzalez MVR, Gómez LG, Hinojosa JGC y Castilla AP. Efecto de carbón tipo lignito sobre el crecimiento y producción de pigmentos de *Arthrospira platensis*. Rev Colomb Biotecnol XVIII: (1) 73-80. 2016
- Gould SB, Waller RF y McFadden GI. Plastid evolution. Annual review of plant biology 59. 2008
- Gouveia L, Neves C, Sebastião D, Nobre BP y Matos CT. Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a photosynthetic alga microbial fuel cell. Bioresource technology 154: 171-177. 2014
- Grima EM, Belarbi E-H, Fernández FA, Medina AR y Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology advances 20: (7) 491-515. 2003
- Grung M, D'Souza FM, Borowitzka M y Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3' S)-astaxanthin esters. Journal of Applied Phycology 4: (2) 165-171. 1992
- Guerrero MG, Rodriguez H, Vargas M, García-González M, Campo JAd, Moreno J y cols. Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. 1999
- Halim R, Harun R, Danquah MK y Webley PA. Microalgal cell disruption for biofuel development. Applied Energy 91: (1) 116-121. 2012
- Hancke K, Sorell BK, Lund-Hansen LC, Larsen M, Hancke T y Glud RN. Effects of temperature and irradiance on a benthic microalgal community: A combined two-dimensional oxygen and fluorescence imaging approach. Limnology and Oceanography 59: (5) 1599-1611. 2014
- Hernández-Pérez A y Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía 49: (2) 157-173. 2014

- Hernández A. Microbiología industrial. San José, CR: EUNED. pp. 2003
- Hill WR, Rinchar J y Czesny S. Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton. *Freshwater Biology* 56: (9) 1825-1836. 2011
- Hirano M, Ohta A y Abe K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of fermentation and bioengineering* 86: (3) 313-316. 1998
- Ho S-H, Chen C-Y, Lee D-J y Chang J-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems—a review. *Biotechnology advances* 29: (2) 189-198. 2011
- Holland HW. Method and apparatus for preventing scale deposits and removing contaminants from fluid columns. pp. Google Patents. <https://www.google.com/patents/US20150083668>. 2015
- Hristov J. Magnetic field assisted fluidization—a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses. *Reviews in Chemical Engineering* 26: (3-4) 55-128. 2010
- Hsueh H, Li W, Chen H y Chu H. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: (1) 33-39. 2009
- Hu Q. Environmental effects on cell composition. Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK. pp. 2004
- Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S y Das KC. Electromagnetic biostimulation of living cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy applications. *International Journal of Molecular Science* 10: (11) 4719-4722. 2009
- Ibáñez RFS y Rodríguez AC. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* TEOD. *Ecología Aplicada* 5: (1-2) 93-99. 2006
- Jeffrey SW y Humphrey GF. New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplakton. *Biochem Physiol Pflanz* 167: 191-194. 1975

- Kumar M y Sharma M. Status of biofuel production from microalgae in India. *Journal of Integrated Science and Technology* 2: (2) 72-75. 2014
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ y Wijffels RH. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of biotechnology* 162: (1) 21-27. 2012
- Le Quéré C, Raupach MR, Canadell JG, Marland G, Bopp L, Ciais P y cols. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature geoscience* 2: (12) 831. 2009
- Lee Y-K y Shen H. Basic culturing techniques. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* 40. 2004
- Li Z-Y, Guo S-Y, Li L y Cai M-Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. *Bioresource Technology* 98: (3) 700-705. 2007
- Litchman E, Edwards KF, Klausmeier CA y Thomas MK. Phytoplankton niches, traits and eco-evolutionary responses to global environmental change. *Marine Ecology Progress Series* 470: 235-248. 2012
- Luna LG, Álvarez I y Rivero R. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: (2) 27-38. 2011
- Luna LG, Menéndez J, Álvarez I y Flores I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03 T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. *Biotecnología Vegetal* 9: (2). 2009
- Markou G, Vandamme D y Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water research* 65: 186-202. 2014
- Masojidek J, Kopecký J, Koblížek M y Torzillo G. The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): its role in the photosynthetic apparatus. *Plant Biology* 6: (03) 342-349. 2004

- Masojidek J, Koblizek M y Torzillo G. Photosynthesis in microalgae. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology 20. 2004
- Mata TM, Mendes AM, Caetano NS y Martins AA. Sustainability and economic evaluation of microalgae grown in brewery wastewater. Bioresource technology 168: 151-158. 2014
- Melis A, Seibert M y Ghirardi ML. Hydrogen fuel production by transgenic microalgae. Transgenic microalgae as green cell factories 110-121. 2007
- Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S y cols. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in Chlamydomonas. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1763: (7) 578-594. 2006
- Montero-Sánchez Y, Gallo A, Sabina L, Hormaza JV, Gómez J, Eng F y cols. El etanol como factor limitante para el uso de vinaza como medio de cultivo de microalgas En: Medio ambiente, Economía y Desarrollo (Quiñonez L y Luna LG, eds.), pp. 181-185. 2013
- Montero-Sánchez Y, Gallo A, Gómez LM, Álvarez I, Sabina LC, Támbara Y y cols. Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. Investigación y Saberes 1: (2) 37-43. 2012
- Montero-Sánchez Y, Gallo A, Gómez LM, Álvarez I, Sabina LC, Támbara Y y cols. Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. En: Medio ambiente, Economía y Desarrollo,(Quiñonez L y Luna LG, eds.), pp. Esmeraldas, Ecuador. 2013
- Moody JW, McGinty CM y Quinn JC. Global evaluation of biofuel potential from microalgae. Proceedings of the National Academy of Sciences 111: (23) 8691-8696. 2014
- Moreno-Garcia L, Adjallé K, Barnabé S y Raghavan G. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. Renewable and Sustainable Energy Reviews 76: 493-506. 2017
- Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A y Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. Journal of biotechnology 150: (1) 51-56. 2010

- Nezammahalleh H, Ghanati F, Adams TA, Nosrati M y Shojaosadati SA. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology 218: 700-711. 2016
- Ono E y Cuello J. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. Biosystems engineering 96: (1) 129-134. 2007
- Ortega-Salas A y Reyes-Bustamante H. Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo. Avances en Investigación Agropecuaria 16: (2). 2012
- Paliwal C, Ghosh T, George B, Pancha I, Maurya R, Chokshi K y cols. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. Algal Research 15: 24-31. 2016
- Panou M, Zervou S, Christophoridis C, Manolidi K, Triantis T, Kaloudis T y cols. First report of a microcystin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii* strain isolated from Greece. pp. 2016
- Perez-Garcia O, Escalante FM, de-Bashan LE y Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water research 45: (1) 11-36. 2011
- Pires J, Gonçalves A, Martins F, Alvim-Ferraz M y Simões M. Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. Mitigation and adaptation strategies for global change 19: (7) 1109-1117. 2014
- Pruvost J, Le Gouic B, Lepine O, Legrand J y Le Borgne F. Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis. Chemical Engineering Journal 284: 850-861. 2016
- Quevedo O C, Morales V SP y Acosta C A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. Vitae 15: (1) 25-31. 2008
- Ramaraj R, Tsai DD-W y Chen PH. Freshwater microalgae niche of air carbon dioxide mitigation. Ecological engineering 68: 47-52. 2014

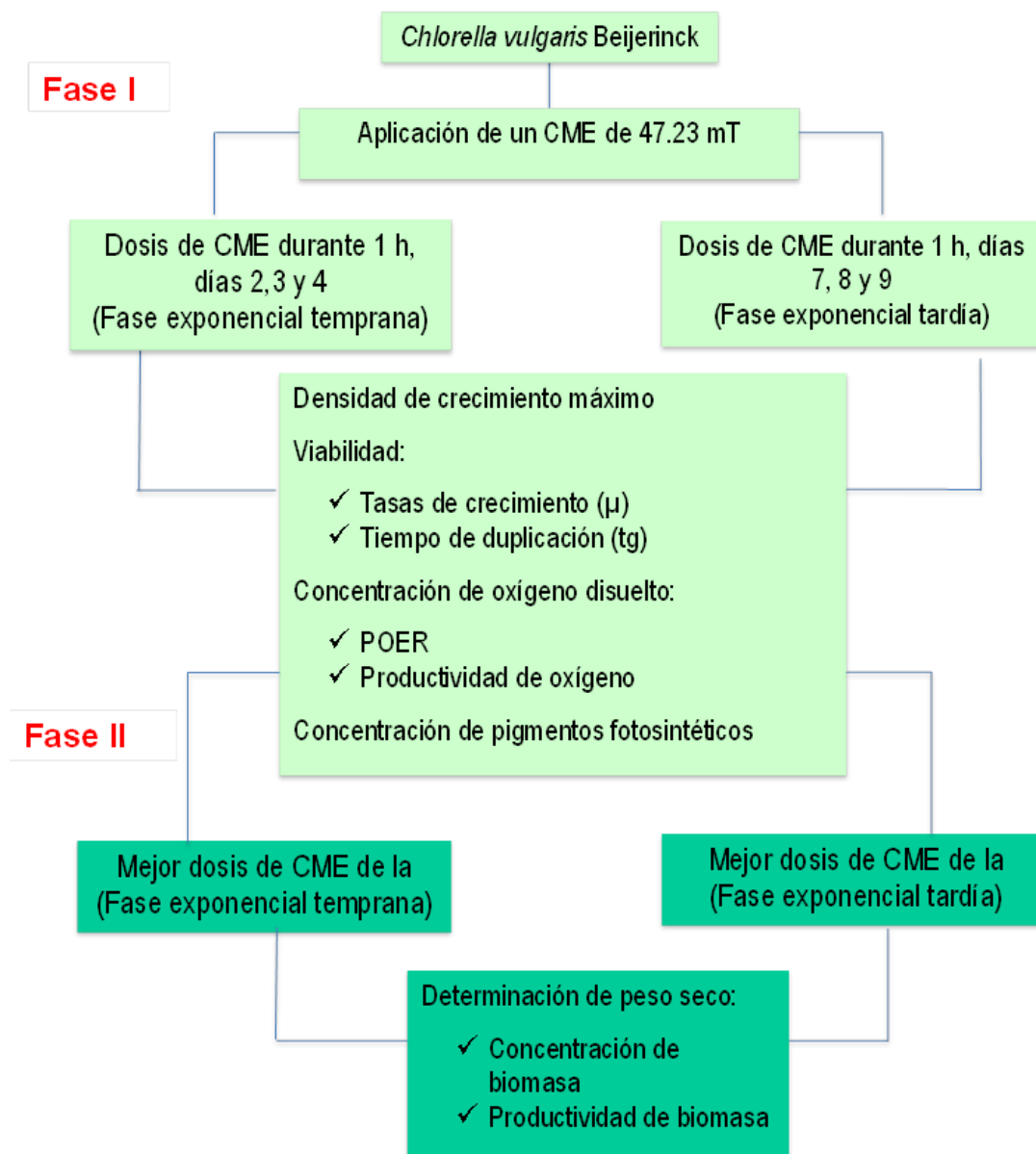
- Ramaraj R, Tsai DD-W y Chen PH. Carbon dioxide fixation of freshwater microalgae growth on natural water medium. *Ecological Engineering* 75: 86-92. 2015
- Ras M, Steyer J-P y Bernard O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in environmental science and bio/technology* 12: (2) 153-164. 2013
- Ribeiro LA, da Silva PP, Mata TM y Martins AA. Prospects of using microalgae for biofuels production: results of a Delphi study. *Renewable Energy* 75: 799-804. 2015
- Rodriguez-Garcia I y Guil-Guerrero JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food chemistry* 108: (3) 1023-1026. 2008
- Roleda MY, Slocombe SP, Leahey RJ, Day JG, Bell EM y Stanley MS. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource technology* 129: 439-449. 2013
- Salama E-S, Kurade MB, Abou-Shanab RA, El-Dalatony MM, Yang I-S, Min B y cols. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 1189-1211. 2017
- Salomón R, Albarracín I y Pio G. Sensibilidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* a la Cipermetrina. Fase preliminar. *Retel* 7: 1-15. 2005
- Sant'Anna L. Chlorococcales (Chlorophyceae). *Journal of Cramery of Germany*. 1984
- Singh y Priyanka. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 431-444. 2015
- Singh P, Guldhe A, Kumari S, Rawat I y Bux F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 94: 22-29. 2015

- Sioen I, Matthys C, Huybrechts I, Van Camp J y De Henauw S. Consumption of plant sterols in Belgium: consumption patterns of plant sterol-enriched foods in Flanders, Belgium. *British journal of nutrition* 105: (6) 911-918. 2011
- Sniegowski PD. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist* 166: (2) 360-362. 2005
- Tadeo-Sánchez L, Puentes-Cárdenas IJ, Flores-Ortiz CM, Sánchez-García D, Pineda-Camacho G y Cristiani-Urbina E. Producción de biodiésel por *Nannochloropsis* sp. bajo diferentes condiciones ambientales. *Revista Cubana de Química* 26: (3) 276-298. 2014
- Tamburic B, Szabó M, Tran N-AT, Larkum AW, Suggett DJ y Ralph PJ. Action spectra of oxygen production and chlorophyll a fluorescence in the green microalga *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource technology* 169: 320-327. 2014
- Tu R, Jin W, Xi T, Yang Q, Han S-F y Abomohra AE-F. Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. *Water research* 86: 132-138. 2015
- Urban MC, De Meester L, Vellend M, Stoks R y Vanoverbeke J. A crucial step toward realism: responses to climate change from an evolving metacommunity perspective. 2011
- Van den Hoek C, Mann DG y Jans HM. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 1995
- Velea S, Dragos N, Serban S, Ilie L, Stalpeanu D, Nicoara A y cols. Biological sequestration of carbon dioxide from thermal power plant emissions, by absorption in microalgal culture media. *Romanian Biotechnological Letters* 14: (4) 4485-4500. 2009
- Vijayaraghavan S y Goswami DY. On evaluating efficiency of a combined power and cooling cycle. *Transactions-American Society Of Mechanical Engineers Journal of Energy Resources Technology* 125: (3) 221-227. 2003

- Wang B, Li Y, Wu N y Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 79: (5) 707-718. 2008
- Wang H-Y, Zeng X-B y Guo S-Y. Effects of electro-magnetic field on the physiological characteristics of *Chlorella vulgaris* and mechanisms analysis. *Fisheries Science* (7). 2005
- Wang H-Y, Zeng X-B y Guo S-Y. Effects of magnetic treatment on ultrastructure of *Chlorella vulgaris*. *Acta Laser Biology Sinica* (4). 2007
- Wang H-Y, Guo S-Y, Zheng B-S y Li L. Accumulating nutrient in *Chlorella vulgaris* enhanced by magnetic-treatment. *Food Science and Technology* (8). 2004
- Wang HY, Zeng XB y Gui SY. Growth of *Chlorella vulgaris* under different magnetic treatments. *Progress in Modern Biomedicine* 12. 2006
- Wang HY, Zeng XB, Guo SY y Li ZT. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. *Bioelectromagnetics* 29: (1) 39-46. 2008
- Wang M, Kuo-Dahab WC, Dolan S y Park C. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella sp.* and *Micractinium sp.*, in wastewater treatment. *Bioresource technology* 154: 131-137. 2014
- Wemba MDK. Variación del crecimiento y la viabilidad celular de *Chlorella vulgaris* Beijerinck en función del pH y el campo magnético estático. pp. Universidad de Oriente. 2017
- Wilson RH y Whitney SM. Improving CO₂ Fixation by Enhancing Rubisco Performance. En: *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications*, pp. 101-126. Springer. 2017
- Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M y Takriff MS. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 21: (1) 6. 2014
- Yang G, Wang J, Mei Y y Luan Z. Effect of Magnetic Field on Protein and Oxygen-production of *Chlorella vulgaris*. *Mathematical and Physical Fisheries Science* 9: 116-126. 2011
- Ying K, Zimmerman W y Gilmour D. Effects of CO and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 6: (3) 167-173. 2014

Anexos

ANEXO 1 DIAGRAMA DE LA LÓGICA DE INVESTIGACIÓN

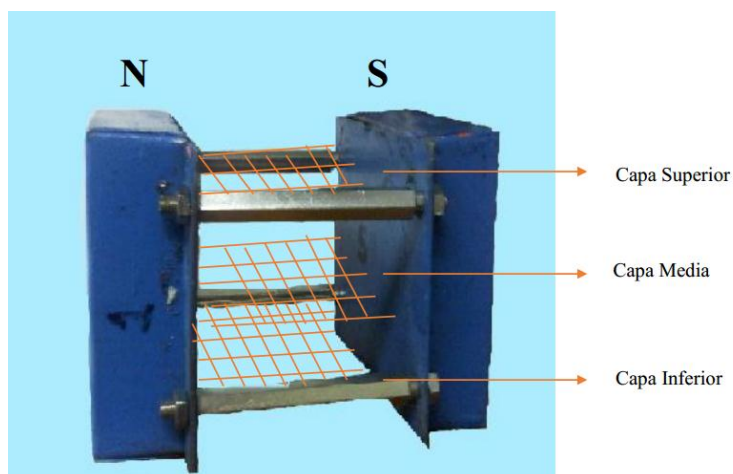


ANEXO 2 INSTALACIÓN EXPERIMENTAL PARA CULTIVOS AIREADOS DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK

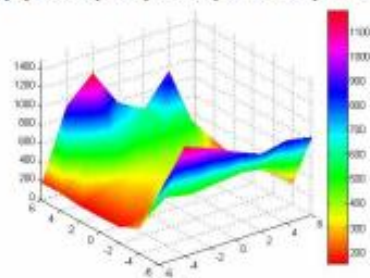


Laboratorio de Ecotoxicología y Servicios Ambientales (LESA), CNEA.

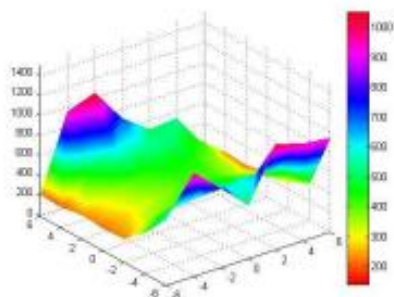
ANEXO 3 ARREGLO DE IMANES



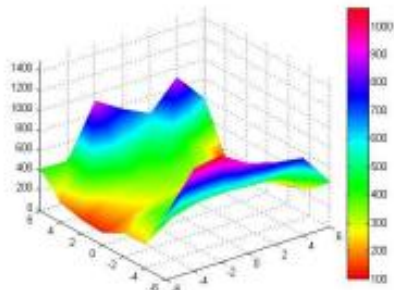
Equipo 2: Compuesto por dos capas de imanes permanentes.

**Capa Inferior**

Valor Máximo: 1189 G
 Valor mínimo: 155 G
 Valor medio: 484.69 G
 Desviación estándar: 75.91 G

**Capa Media**

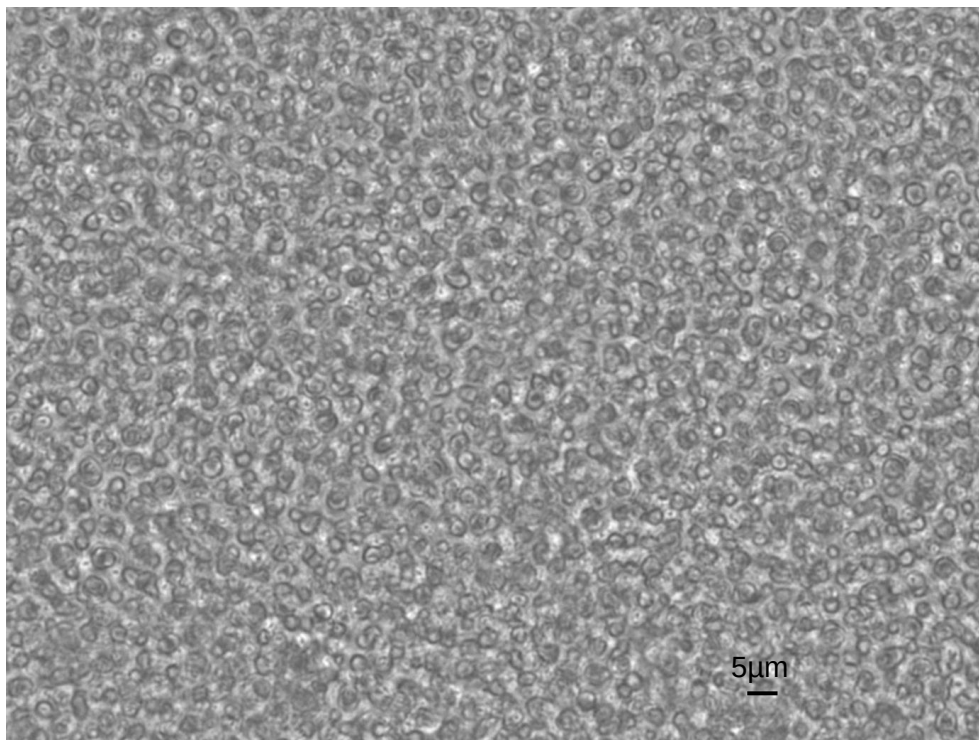
Valor Máximo: 1052 G
 Valor mínimo: 140 G
 Valor medio: 491.75 G
 Desviación estándar: 68.67 G

**Capa Superior**

Valor Máximo: 1065 G
 Valor mínimo: 100 G
 Valor medio: 439.71 G
 Desviación estándar: 47.45 G

El error de la inducción magnética no supera $\pm 5\%$ de los valores reportados.

ANEXO 4 CULTIVO DENSO DE *C. VULGARIS* BEIJERINCK



Fotografía tomada con el microscopio invertido Zeiss Axio de cultivos densos de *C. vulgaris* Beijerinck, con aumento de 40x.