



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERÍA

**EFECTO DE LONGITUDES DE ONDA Y  
DEFICIENCIA DE FÓSFORO, CARBONO  
Y NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE  
BIOMASA Y PHB EN CULTIVOS DE**

*Nostoc linkia*

**JHON ALBERT CENTENO TORRES**

Tesis para optar al grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:  
**CÉSAR ANTONIO SÁEZ NAVARRETE**

Santiago de Chile, agosto, 2021

© 2021, Jhon Albert Centeno Torres



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERÍA

**EFFECTO DE LONGITUDES DE ONDA Y  
DEFICIENCIA DE FÓSFORO, CARBONO  
Y NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE  
BIOMASA Y PHB EN CULTIVOS DE  
*Nostoc linckia***

**JHON ALBERT CENTENO TORRES**

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

**CÉSAR SÁEZ NAVARRETE**

**WENDY FRANCO MELAZZINI**

**ÁLVARO DÍAZ BARRERA**

**ÁLVARO SOTO ARRIAZA**

Para completar las exigencias del grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, agosto, 2021

A Dios, quién guía mis pasos y es a quien va dirigido todo mi esfuerzo. A mi madre, Antonia (Q.E.P.D), una gran mujer de esfuerzo que me enseñó a no rendirme nunca. A mi padre, José y a mi hermana, Ana, que día a día me demostraron su apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi querido Supervisor, César Sáez, por brindarme su apoyo y su confianza desde el primer momento. Gracias por guiarme y apoyarme, en el desarrollo de la presente tesis.

A Leonardo, quien me apoyó en los ensayos necesarios para terminar el trabajo de investigación, siempre estuvo al tanto de mi avance. A Danisa Herrera y a Isabel Alarcón por su orientación en los trámites gracias por todo su apoyo.

A Álvaro Díaz, profesor de la PUCV, por su colaboración y apoyo en la determinación y cuantificación de PHB que fueron fundamentales en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi grupo de trabajo Germán, Felipe, Juan Pablo, buenos amigos quienes me ayudaron en el desarrollo de la tesis dándome una mano en el laboratorio.

A mi familia, tía Simona, y mis primos elena, Lucy, Nancy, Janett, Alex, por su apoyo y comunicación, por los ánimos que me daban para seguir adelante.

A mis amigos y amigas que siempre con sus consejos me ayudan a tomar buenas decisiones y seguir el camino correcto. A Carlos López, estimado amigo, quien me apoya siempre. A Miriam, mi amiga de toda la vida. A Maricely, Paula, Gustavo, Víctor Mercado, José Rebolledo, Esperanza Rodríguez, Sophia, siempre los recordaré por hacerme sentir en familia.

Por último, agradezco al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo del Perú (PRONABEC) por el apoyo y financiamiento mediante la Beca presidente de la República y haber confiado en mí esta misión importante de retribuir a mi país con nuevos conocimientos que serán una gran herramienta para la investigación y desarrollo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
1. MARCO DE ESTUDIO .....	1
1.1 Importancia del cultivo de microalgas en la problemática ambiental .....	1
1.1.1 Microalgas y control de la contaminación .....	1
1.1.2 Microalgas y producción de energía.....	2
1.1.3 Microalgas para la producción de biomasa y bioplástico .....	2
1.2 Cianobacterias y <i>Nostoc linckia</i> .....	3
1.2.1 Fijación de CO <sub>2</sub> y bicarbonato en el cultivo de cianobacterias .....	4
1.2.2 Fijación de nitrógeno atmosférico en cianobacterias .....	5
1.2.3 Factores que afectan la producción de biomasa en cianobacterias .....	6
1.3 De plásticos convencionales a bioplásticos biodegradables .....	8
1.3.1 Plásticos convencionales.....	9
1.3.2 Bioplásticos.....	9
1.3.3 Polihidroxialcanoatos (PHA).....	11
1.3.4 Biosíntesis y función biológica de los PHA en cianobacterias.....	12
1.3.5 Estado actual de la producción de PHA a partir de microorganismos heterotróficos y cianobacterias .....	14
1.3.6 Factores que influyen en la producción de PHB en cianobacterias .....	15

1.4	Diodos emisores de luz y su efecto en la producción de biomasa y biomateriales.....	16
1.5	Hipótesis y objetivo de la tesis.....	17
2.	EFFECTO DE LA LONGITUDES DE ONDA DE LUZ Y DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, MORFOLOGÍA Y ACUMULACIÓN DE PHB EN CULTIVOS DE <i>Nostoc linckia</i> .....	18
2.1	Introducción .....	18
2.2	Materiales y métodos .....	19
2.2.1	Medio de cultivo y condiciones de cultivo en <i>Nostoc linckia</i> .....	19
2.2.2	Método de reactivación de la cianobacteria <i>Nostoc linckia</i> .....	20
2.2.3	Obtención de inóculo a partir del cultivo madre de <i>Nostoc linckia</i> .....	20
2.2.4	Método de cuantificación de biomasa seca.....	21
2.2.5	Método de cuantificación de PHB en biomasa seca mediante HPLC.....	22
2.3	Ensayos experimentales .....	23
2.3.1	Determinación de la curva de crecimiento de <i>Nostoc linckia</i> .....	23
2.3.2	Determinación del efecto de la deficiencia de carbono y fósforo en la acumulación de PHB en cultivo por lotes de <i>Nostoc linckia</i> .....	24
2.3.3	Determinación del efecto de longitudes de onda de luz en la producción de biomasa en cultivos de <i>Nostoc linckia</i> .....	26
2.3.4	Determinación del efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la producción de biomasa y morfología en cultivos de <i>Nostoc linckia</i> .....	27
2.3.5	Análisis estadístico .....	29
2.4	Resultados y discusión .....	30

2.4.1	Curva de crecimiento de <i>N. linckia</i> en medio ES modificado .....	30
2.4.2	Efecto de la deficiencia de fósforo y carbono en la producción de biomasa y acumulación de PHB en cultivos de <i>Nostoc linckia</i> .....	32
2.4.3	Efecto de diferentes longitudes de onda en una segunda fase de cultivo en la producción de biomasa de <i>Nostoc linckia</i> .....	35
2.4.4	Efecto de longitudes de onda de luz, deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en una segunda fase de cultivo en la producción de biomasa en <i>Nostoc linckia</i> .....	40
2.4.5	Efecto de longitudes de onda de luz azul, rojo y verde en la morfología microscópica en cultivos de <i>Nostoc linckia</i> .....	44
2.4.6	Efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la morfología microscópica de <i>Nostoc linckia</i> .....	46
2.5	Conclusiones .....	49
	REFERENCIAS .....	51
	A N E X O S.....	61
	ANEXO A: DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PHB POR HIDROLISIS ÁCIDA.....	62
	ANEXO B: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO CROTÓNICO.....	63
	ANEXO C: PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO ES .....	64
	ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DIFERENCIAS DE MEDIAS DE DUNCAN MEDIANTE SPSS.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2-1: Efecto del bicarbonato y deficiencia de fósforo en la acumulación de PHB (% biomasa seca) en cultivos por lotes de <i>Nostoc linckia</i> .....	32
Tabla 2-2: Efecto de diferentes longitudes de onda de luz en la producción de biomasa a los 4 días de incubación .....	36
Tabla 2-3: Efecto de diferentes longitudes de onda de luz en la producción de biomasa a los 12 días de incubación .....	37
Tabla 2-4: Grupos homogéneos entre tratamientos del efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de N, P, y C en la producción de biomasa .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Clasificación taxonómica de la especie <i>Nostoc linckia</i> .....	4
Figura 1-2: Representación esquemática de las vías de asimilación del nitrógeno .....	6
Figura 1-3: Clasificación de plásticos de acuerdo a su biodegradabilidad y a la fuente de donde se obtienen .....	8
Figura 1-4: Capacidades de producción mundial de bioplásticos .....	10
Figura 1-5: Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de PHB. phaA: $\beta$ -cetotiolasa, phaB: acetoacetil-coA reductasa, phaC/phaE: PHB sintasa .....	13
Figura 2-1: Curva de crecimiento de <i>Nostoc linckia</i> en el medio ES modificado en cultivo por lotes .....	30
Figura 2-2: Efecto del bicarbonato y deficiencia del fósforo en cultivos por lotes de <i>Nostoc linckia</i> en la acumulación de PHB (%). .....	33
Figura 2-3: Efecto de longitudes de onda de luz azul (470nm), roja (660nm) y verde (520nm) en la producción de biomasa de <i>Nostoc linckia</i> .....	38
Figura 2-4: Efecto de la deficiencia de nitrógeno, fósforo, carbono, luz azul (470nm) y roja (660nm) en la producción de biomasa .....	41
Figura 2-5: Observación microscópica en fresco a mayor aumento (400X) en un microscopio (Motic serie BA310) del cultivo de <i>N. linckia</i> : (A) Tratamiento control luz LED blanca, (B) Tratamiento con luz LED roja (660nm), (C) Tratamiento con luz LED azul (470nm) y (D) Tratamiento con luz LED verde (520nm). .....	44
Figura 2-6: Observación microscópica en fresco a mayor aumento (400X) en un microscopio (Motic serie BA310) del cultivo de <i>N. linckia</i> : (A) Tratamiento control con medio ES, (B) Tratamiento deficiente en N y P, (C) Tratamiento deficiencia de N, P y C, (D) Tratamiento deficiencia de N y P con luz LED rojo (660nm) y (E) Tratamiento deficiencia de N y P con luz LED azul (470nm). .....	46

## RESUMEN

En el presente trabajo se utilizó una cepa de *Nostoc linckia*. Para su crecimiento se utilizó el medio ES modificado, a una intensidad de luz de  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mediante luces LED color blanco, bajo luz continua 24:0, a 25 °C. Se determinó la curva de la cinética de crecimiento con una tasa de crecimiento de ( $\mu$ ) igual a  $0,00328 \text{ h}^{-1}$  ( $0,079 \text{ d}^{-1}$ ) en el medio ES modificado. Luego, se evaluó el efecto del bicarbonato, deficiencia de fósforo y deficiencia de carbono sobre la producción de biomasa y PHB; logrando determinar una acumulación de PHB en 0,668 % (% biomasa seca) cuando se mantenía en medio sin bicarbonato (0 g/L) este valor es considerado muy bajo y fue similar en todos los tratamientos, por lo tanto, es posible que exista algún compuesto que este inhibiendo o limitando el crecimiento. Se realizó un experimento en dos fases, la primera para producción de biomasa y la segunda fase de bioacumulación. En la segunda fase se evaluó el efecto de longitudes de onda de luz roja (660nm), azul (470nm) y verde (520nm) luego de 12 días de incubación, encontrando que con la luz roja y control con luz LED blanca, se produjo mayor cantidad de biomasa con un promedio de 0,2207 g/L y 0,2479 g/L ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Por último, se evaluó el efecto interactivo de las longitudes de onda de luz roja y azul con la deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la producción de biomasa y morfología durante una segunda fase de bioacumulación. Se obtuvo que el tratamiento control con luz blanca y el tratamiento deficiente en fósforo y nitrógeno, produjeron mayor cantidad de biomasa con un promedio de 0,259 g/L y 0,238 g/L, respectivamente ( $p < 0,05$ ) y los tratamientos con luz roja y azul y deficiente en nitrógeno y fósforo produjeron menor cantidad de biomasa con un promedio de 0,138 g/L y 0,101 g/L ( $p < 0,05$ ), respectivamente; aproximadamente 50 % menos. Esto ha sugerido que hay un efecto sinérgico que afecta negativamente la producción de biomasa.

Palabras Claves: *Nostoc linckia*, deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono, PHB, luz LED, longitudes de onda de luz, producción de biomasa, cianobacterias.

## ABSTRACT

In the present work, a strain of *Nostoc linckia* was used. For its growth, the modified ES medium was used, at a light intensity of  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  by means of white LED lights, under continuous light 24: 0, at 25 ° C. The growth kinetic curve was determined with a growth rate of ( $\mu$ ) equal to  $0,00328 \text{ h}^{-1}$  ( $0,079 \text{ d}^{-1}$ ) in the modified ES medium. Then, the effect of bicarbonate, phosphorus deficiency and carbon deficiency on biomass and PHB production was evaluated; achieving to determine an accumulation of PHB in 0,668% (% dry biomass) when it was kept in a medium without bicarbonate (0 g/L) this value is considered very low and was similar in all treatments, therefore, it is possible that there is some compound that is inhibiting or limiting growth. An experiment was carried out in two phases, the first for biomass production and the second for bioaccumulation. In the second phase, the effect of wavelengths of red light (660nm), blue (470nm) and green (520nm) was evaluated after 12 days of incubation, finding that with the red light and control with white LED light, it was produced greater amount of biomass with an average of 0,2207 g/L and 0,2479 g/L ( $p < 0,05$ ), respectively. Finally, the interactive effect of red and blue light wavelengths with nitrogen, phosphorus and carbon deficiency in biomass production and morphology was evaluated during a second bioaccumulation phase. It was obtained that the control treatment with white light and the treatment deficient in phosphorus and nitrogen, produced a greater amount of biomass with an average of 0,259 g/L and 0,238 g/L, respectively ( $p < 0,05$ ) and the light treatments red and blue and deficient in nitrogen and phosphorus produced less biomass with an average of 0,138 g/L and 0,101 g/L ( $p < 0,05$ ), respectively; about 50% less. This has suggested that there is a synergistic effect negatively affecting biomass production.

Keywords: *Nostoc linckia*, nitrogen deficiency, phosphorus deficiency, carbon deficiency, PHB, LED light, light wavelengths, biomass production, cyanobacteria.

## **1. MARCO DE ESTUDIO**

### **1.1 Importancia del cultivo de microalgas en la problemática ambiental**

El inminente aumento de la población mundial total podría alcanzar los 10 mil millones para el 2050 (Y. Fu et al., 2021), lo que trae consigo que se incremente el consumo excesivo de materiales y recursos naturales, así como el consumo de combustibles fósiles que trae impactos nocivos en el medio ambiente y la vida en la tierra (Vieira de Mendonça et al., 2021). Las energías renovables se consideran una alternativa de mitigación de dichos problemas como del calentamiento global (Che et al., 2019).

#### **1.1.1 Microalgas y control de la contaminación**

El incremento de la población trae consigo la producción de desechos sólidos y aguas residuales, así como de altas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Vieira de Mendonça et al., 2021). Los principales gases GEI que impulsan el cambio climático global son el CO<sub>2</sub> (principal GEI que contribuye en más del 70 % de las emisiones totales globales), el metano y el óxido nitroso (Ritchie, 2020). Las microalgas tienen capacidad de eliminar de 10 a 50 veces más CO<sub>2</sub> que las plantas terrestres, ya que contienen mayor concentración de clorofila (Vieira de Mendonça et al., 2021). Esta capacidad de las microalgas las convierte en una alternativa para reducir el efecto de los GEI.

### **1.1.2 Microalgas y producción de energía**

La biomasa de microalgas puede utilizarse para producir biogás, bioetanol, biodiesel, y biohidrógeno como fuente de energía renovable. A este tipo de energía obtenida de organismos vivos fotosintéticos se denominan biocombustibles de tercera generación (Kwan, Banerjee, Shariff, & Md. Yusoff, 2021; Rebolledo, 2019).

### **1.1.3 Microalgas para la producción de biomasa y bioplástico**

Las microalgas se han estudiado en la producción de alimentos y pigmentos como de productos de alto valor y bioplástico (Duarte, de Souza, Druzian, & Costa, 2019). El uso de algas como proveedores de materias primas renovables es muy adecuado para aumentar la eficiencia económica de los plásticos. Las algas tienen ciclos de generación muy cortos y por lo tanto pueden suministrar muchas materias primas renovables en poco tiempo, así como, el almidón, celulosa, ácido poliláctico y poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). Sin embargo, las algas como proveedores de materias primas aún no están bien investigadas (Haase, Huchzermeyer, & Rath, 2012). Algunas especies de cianobacterias producen un alto contenido de aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados, además de ficocianina (pigmento con propiedades nutraceuticas) (Prates, Radmann, Duarte, Morais, & Costa, 2018). Estos productos son producidos mediante su maquinaria fotosintética a partir de energía solar con una eficiencia de conversión de energía del 3 al 9 %. Uno de los bioplásticos de importancia son los

Polihidroxialcanoatos (PHA) que pueden ser producidos en condiciones fotoautotróficas utilizando CO<sub>2</sub> y luz solar (Yashavanth, Das, & Maiti, 2021).

## **1.2 Cianobacterias y *Nostoc linckia***

Las cianobacterias también conocidas como algas verdeazules, son procariontes gramnegativas que realizan fotosíntesis oxigénica. Tienen la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> y algunas cianobacterias también pueden fijar nitrógeno atmosférico. Las cianobacterias son microorganismos acuáticos; por lo que no necesitan de tierras fértiles para su cultivo. En algunos casos han sido cultivadas con aguas residuales que proveen de nitrógeno y fósforo necesario. Presentan un ciclo de vida corto con requerimientos nutricionales simples para su crecimiento y desarrollo. Así, requieren Fósforo (P), Nitrógeno (N), Magnesio (Mg), Potasio (K) y Calcio (Ca), como macronutrientes; y Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co) y Cobre (Cu), como micronutrientes (A. K. Singh, Sharma, Mallick, & Mala, 2017; Troschl, Meixner, & Drosch, 2017).

En cuanto al metabolismo de las cianobacterias, se sabe que pueden presentar tres formas de crecimiento celular. El primero y más importante es el fotoautotrófico, donde fijan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y obtienen su energía a partir de la luz. El segundo, es el metabolismo heterotrófico, mediante el cual obtienen energía y fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos; y finalmente, el metabolismo mixotrófico, mediante el cual las cianobacterias pueden emplear tanto carbono

inorgánico como orgánico en presencia de luz para su metabolismo (Beardall & Raven, 2016; A. K. Singh et al., 2017).

A continuación se presenta la taxonomía del género *Nostoc* (Figura 1-1) (“NCBI Taxonomy,” 2021; Ponce, 2014).

Dominio:	Bacteria
Filo:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Orden:	Nostocales
Familia:	Nostocaceae
Género:	<i>Nostoc</i>
Especie:	<i>Nostoc linckia</i>

Figura 1-1: Clasificación taxonómica de la especie *Nostoc linckia*.

El CAT (Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos) se describe que no es esencial para la célula en condiciones de crecimiento fotoautótrofo y durante un tiempo se supuso que estaba incompleto debido a la ausencia de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, pero poseen una ruta alternativa, en la que el 2-oxoglutarato se metaboliza a succinato a través del semialdehído succínico como intermediario. En *Synechocystis* 6803 el flujo metabólico entre el 2-oxoglutarato y succinato de la rama oxidativa del CAT es relativamente bajo, y la mayoría del 2-oxoglutarato se usa para la asimilación de nitrógeno en condiciones fotoautotróficas (Iijima et al., 2021; Mock, Schmid, & Bühler, 2019).

### **1.2.1 Fijación de CO<sub>2</sub> y bicarbonato en el cultivo de cianobacterias**

El presente trabajo de investigación está enmarcado en el metabolismo fotoautotrófico por lo que se centrará en la fijación de carbono inorgánico principalmente CO<sub>2</sub> y bicarbonato. Tanto las microalgas como las cianobacterias dependen de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) y el ciclo de reducción de carbono fotosintético (Ciclo de Calvin) para la asimilación total de carbono inorgánico hacia materia orgánica (Beardall & Raven, 2016).

Las microalgas son capaces de utilizar tanto CO<sub>2</sub> como el anión bicarbonato, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como fuente de carbono. Por su parte, para las cianobacterias, su principal fuente de carbono en la naturaleza es el bicarbonato (Su, 2021).

### **1.2.2 Fijación de nitrógeno atmosférico en cianobacterias**

Las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno en una célula diferenciada y especializada llamada heterocisto, que mantienen un ambiente anóxico que es favorable para el funcionamiento de la enzima Nitrogenasa. Esta enzima cataliza la reducción del N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub> (Mishra, Kaushik, & Tiwari, 2019). Los heterocistos son fotosintéticamente inactivos, su formación es reprimida por fuentes de nitrógeno como amonio o nitrato. La fijación de nitrógeno por las cianobacterias aumenta la reserva de N<sub>2</sub> en el suelo y este balance positivo de nitrógeno del suelo tiene beneficios para la fertilidad del suelo (Alvarez, Weyers, Goemann, Peyton, & Gardner, 2021).

Además de fijar nitrógeno como  $N_2$ , también pueden asimilar diferentes formas de nitrógeno del ambiente como nitrato, nitrito, urea o amonio, los cuales son incorporados a los esqueletos carbonatados a través de la acción de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), conformando así el ciclo GS-GOGAT para la asimilación central del nitrógeno (Figura 1-2).

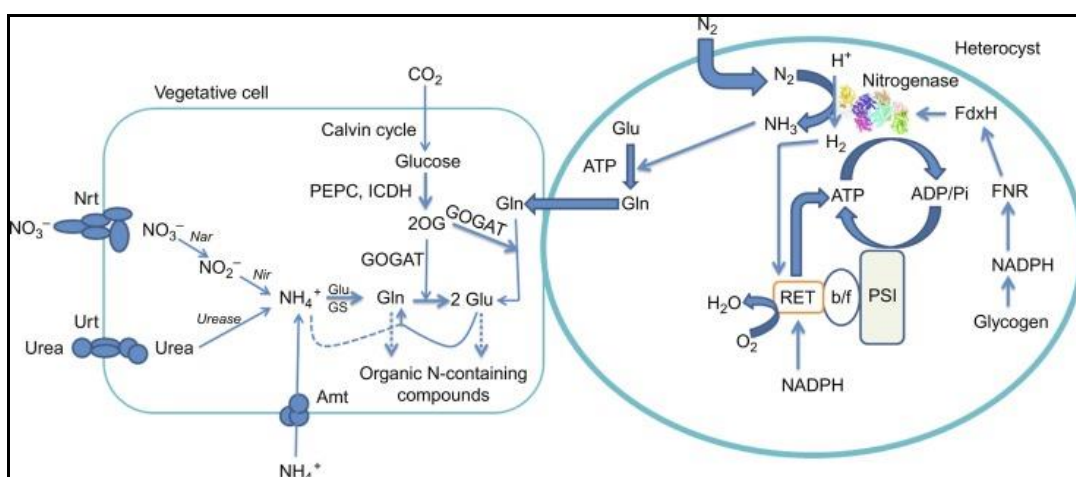


Figura 1-2: Representación esquemática de las vías de asimilación del nitrógeno (Mishra et al., 2019)

### 1.2.3 Factores que afectan la producción de biomasa en cianobacterias

En el cultivo de microalgas, existen muchos factores que influyen en su producción de biomasa. Entre ellos, se tiene la luz (intensidad y longitud de onda), pH del medio, temperatura del medio, tipo de medio de cultivo, salinidad del medio, concentración de  $CO_2$  o bicarbonato (Gatamaneni, Orsat, & Lefsrud, 2018). La luz es uno de los factores más importantes durante el cultivo de microalgas y cianobacterias. Los factores de luz como la longitud de onda, intensidad y

periodicidad influyen en la producción de biomasa y contenido intracelular (W. Fu et al., 2013; Kwan et al., 2021).

Las fuentes de luz pueden ser naturales (luz solar) o artificiales. La luz solar presenta deficiencias, ya que no se puede controlar el fotoperiodo y su intensidad de luz por cada fracción de su espectro. Actualmente, la luz artificial con mayor aceptación incluye diodos emisores de luz o LED. Las luces LED presentan ciertas ventajas sobre otras fuentes de luz artificial como emitir una longitud de onda única con muy baja dispersión, son de pequeño tamaño para poder ser usado en fotobiorreactores, poseen una alta eficiencia de conversión de electricidad entre 30 a 40 % el resto se irradia en forma de calor, producen menor emisión de calor hasta en un 70 % con un consiguiente menor consumo de energía y poseen una mayor vida útil que alternativas no LED (Kwan et al., 2021; Prates et al., 2018).

Investigaciones en cultivos fotosintetizadores revelaron que el aumento de la duración de la intensidad de luz aumenta directamente el crecimiento de microalgas (mayor flux de fotones en el tiempo). Sin embargo, a elevadas intensidades puede producir daño irreversible en el aparato fotosintético, lo que se conoce como fotoinhibición (Gatamaneni et al., 2018).

Por su parte, el aumento de la temperatura es favorable para la mayoría de las cianobacterias, ya que incrementa su crecimiento y producción de biomasa, hasta que alcanza un nivel óptimo, luego disminuye con cualquier aumento adicional de temperatura. Las temperaturas inferiores a 16 °C y superiores a 30 °C se consideran completamente inadecuadas para el crecimiento de cianobacterias (Gatamaneni et al., 2018). Por su parte, temperaturas entre 20 °C a 28 °C, se

consideran las más adecuadas para obtener tasas máximas de replicación celular (S. Singh, 2019).

### 1.3 De plásticos convencionales a bioplásticos biodegradables

En general, los plásticos son materiales que contienen como ingrediente esencial una o más sustancias poliméricas orgánicas de alto peso molecular. Los plásticos pueden clasificarse de acuerdo a si son biodegradables o no biodegradables y si son obtenidos a partir de recursos no renovables o renovables (Figura 1-3) (Bruder, 2019).

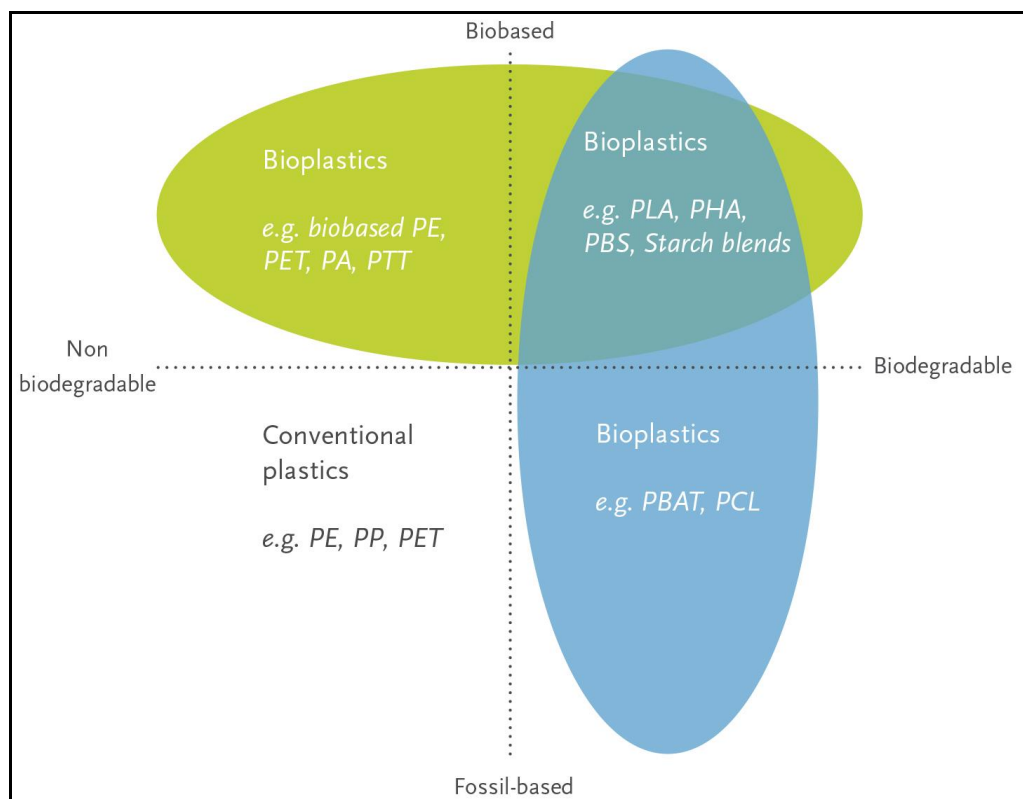


Figura 1-3: Clasificación de plásticos de acuerdo a su biodegradabilidad y a la fuente de donde se obtienen (European Bioplastics, 2020).

### **1.3.1 Plásticos convencionales**

Los plásticos convencionales son plásticos no biodegradables obtenidos a partir de recursos no renovables o combustibles fósiles. Actualmente se producen 359 millones de toneladas de plástico y menos del 1 % de ese plástico corresponde a bioplásticos (European Bioplastics, 2020). Además, la producción total acumulada de plástico desde su producción en 1950 superó los 8,3 mil millones de toneladas (Gt) del cual 6,3 Gt resultaron en residuos plásticos. De estos tan sólo el 21 % ha sido reciclado o incinerado: el 79 % restante ha sido dispuesto en rellenos sanitarios o liberado al medio ambiente (Karan, Funk, Grabert, Oey, & Hankamer, 2019).

### **1.3.2 Bioplásticos**

Los bioplásticos son plásticos manufacturados a partir de materia prima de origen biológico o de base biológica. Estos bioplásticos pueden ser biodegradables o no biodegradables (Bruder, 2019). Según la clasificación de la Asociación de Bioplásticos Europeos como bioplásticos están incluidos: Bioplásticos biodegradables en base a recursos renovables, bioplásticos biodegradables en base a recursos no renovables (derivados del petróleo) y a los bioplásticos no biodegradables en base a recursos renovables (Figura 1-3). Los más importantes bioplásticos biodegradables de origen biológico obtenido de recursos renovables son el ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxicanoatos (PHAs) (European bioplastics, 2020) (Figura 1-4). Este último grupo de bioplásticos está en la mira a

futuro ya que contribuyen con los objetivos de sustentabilidad de las Naciones Unidas, es decir, en buena salud y bienestar, agua limpia y saneamiento, energía limpia, innovación, comunidades sostenibles, consumo y producción responsable, acción climática, y vida bajo el agua y en la tierra (Karan et al., 2019).

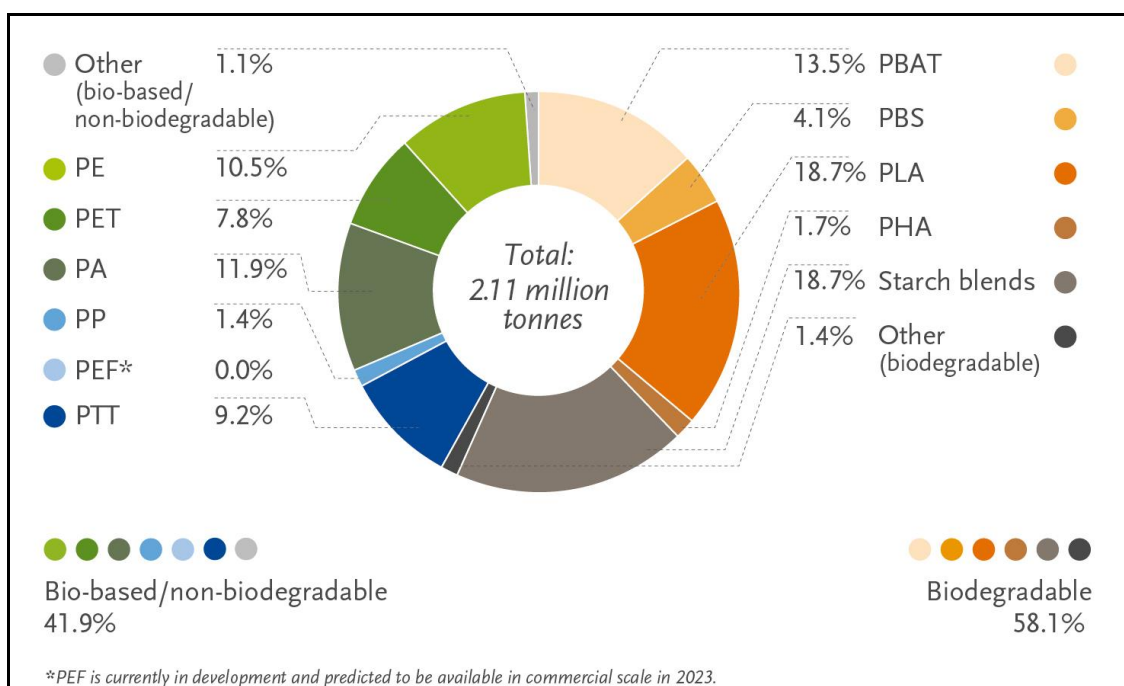


Figura 1-4: Capacidades de producción mundial de bioplásticos (European bioplastics, 2020).

Cabe recalcar que los plásticos biodegradables se refieren a polímeros que son capaces de sufrir descomposición en dióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos o en biomasa mediante mecanismos de acción enzimática de los microorganismos, concepto del cual debe diferenciarse de desintegración, en el que el material se divide en piezas pequeñas y separadas (Niaounakis, 2013).

### **1.3.3 Polihidroxialcanoatos (PHA)**

Son una familia de poliésteres biodegradables que se sintetizan en la célula microbiana y se acumulan en inclusiones citoplasmáticas como material de almacenamiento. Estos polímeros tienen buenas propiedades de deformación y mecánicas similares al polipropileno, además de baja permeabilidad al agua (Bruder, 2019). Existen tres tipos de PHA, el primer tipo son los PHA de cadena corta (3-5 carbonos) el más conocido es el polihidroxi-butarato (PHB), el segundo tipo es el PHA de cadena media (6-14 carbonos) con mejores propiedades elastoméricas y de deformación. El tercer tipo de PHA contienen diferentes proporciones de PHA de cadena corta y de cadena media como es el copolímero poli (3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) (Zhang, Show, & Ho, 2019). La producción actual de PHA en el mundo utiliza cultivos heterotróficos. A pesar de estos avances biotecnológicos, las bacterias heterotróficas aeróbicas requieren grandes cantidades de carbono orgánico y oxigenación que representan entre el 30 % al 50 % del costo total de la biosíntesis de PHA (Rueda et al., 2019). Por lo tanto, la producción y comercialización de PHA bacterianos no son rentables en comparación con otros plásticos convencionales, llegando a costar 18 veces más que los plásticos convencionales como el polietileno y polipropileno (A. K. Singh et al., 2017).

El PHB tiene muchas características diferentes como la capacidad de procesamiento termoplástico, la no toxicidad y características altamente cristalinas. Esto podría ser una buena alternativa a los plásticos fósiles. El punto de fusión es

de aproximadamente 179 °C y el polímero no está ramificado por lo tanto se puede derretir fácilmente durante la producción, con la adición de diferentes componentes se pueden crear características que son similares al polipropileno y el polietileno. El PHB es un polímero resistente al agua y completamente biodegradable en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Estos se pueden utilizar tanto en la manufactura de envases y embalajes como para la producción de artículos de tocador, o en aplicaciones médicas y farmacéuticas dada su biocompatibilidad (Haase et al., 2012).

#### **1.3.4 Biosíntesis y función biológica de los PHA en cianobacterias**

La producción de PHA por las cianobacterias fue reportado por primera vez en el año 1966 en la cianobacteria *Chlorogloea fritschii*, fijadora de nitrógeno, la cual fue cultivada con suplementos de acetato por el profesor Carr de la Universidad de Warwick en Reino Unido (Carr, 1966; A. K. Singh et al., 2017). Las cianobacterias producen PHB como un compuesto de almacenamiento de carbono y energía intracelular. Además, sirven como un sumidero de electrones y ayudan a restaurar el NADP+, apoyando la resistencia al estrés de la célula. En general las concentraciones de PHB en cianobacterias fotoautotróficas privadas de nutrientes oscilan entre 5 y 20% del peso seco celular (Troschl et al., 2018). Los PHA de cadena corta se sintetizan a partir de la acetil-CoA a través de 3 reacciones enzimáticas (Figura 1-5). La  $\beta$ -cetotiolasa convierte dos moléculas de acetil-CoA en una molécula de acetoacetil-CoA, la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de

NADPH convierte la acetoacetyl-CoA en D-3-hidroxiacetyl-CoA y la última enzima PHB sintasa cataliza la unión de la D-3-hidroxiacetyl-CoA a una molécula de PHA existente a través de un enlace éster (Costa, Miranda, de Morais, Costa, & Druzian, 2019). Los PHA de cianobacterias son acumulados como gránulos con un núcleo hidrofóbico rodeado de proteínas (Hong, Beld, Davis, Burkart, & Palenik, 2021).

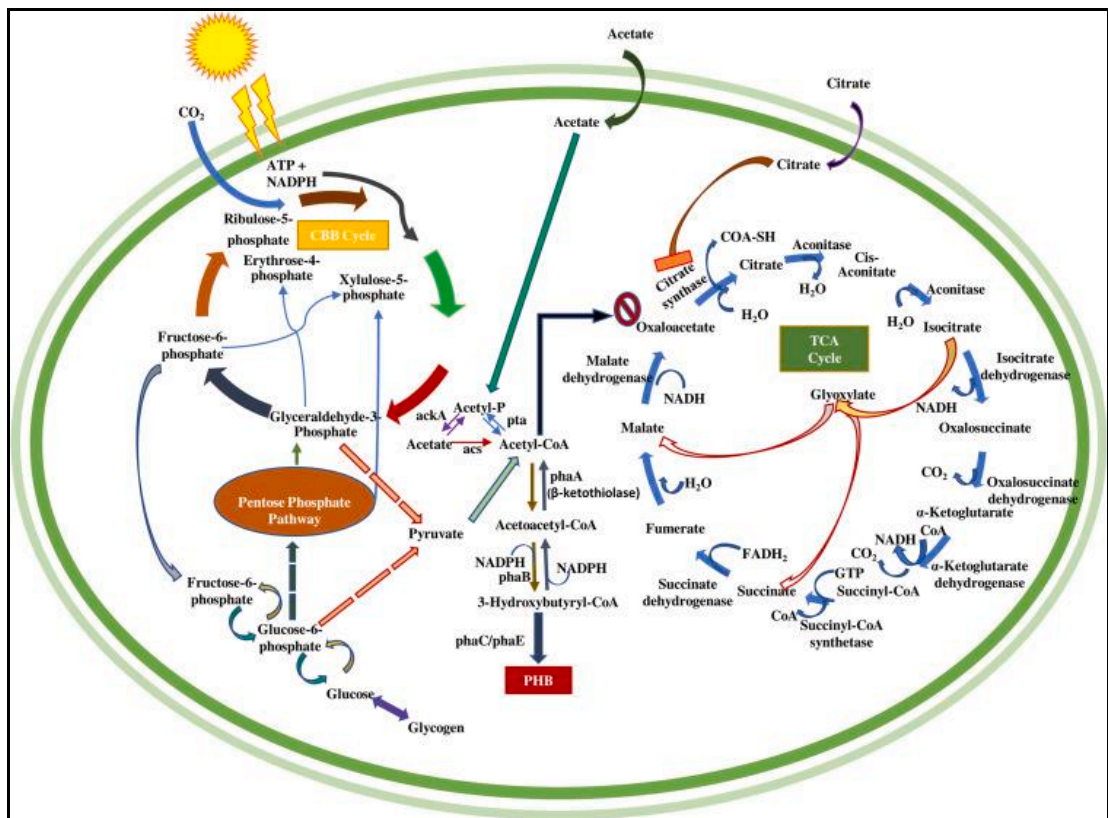


Figura 1-5: Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de PHB. phaA:  $\beta$ -cetotiolasa, phaB: acetoacetyl-coA reductasa, phaC/phaE: PHB sintasa (Yashavanth, Das, & Maiti, 2021).

### **1.3.5 Estado actual de la producción de PHA a partir de microorganismos heterotróficos y cianobacterias**

Teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales mínimos del metabolismo fotoautotrófico de las cianobacterias, han tomado interés en las últimas décadas como una alternativa prometedora para producir PHA de forma rentable, viable comercialmente y sostenible con el medio ambiente; el cual puede superar las limitaciones actuales del elevado costo de producción de PHA por el requerimiento de fuentes de carbono orgánicos en microorganismos heterotróficos, que en la actualidad puede llegar a costar hasta 4 US\$/kg, en comparación, con los plásticos convencionales como el polietileno que llega a costar 0,35 US\$/kg (Bhati, Samantaray, Sharma, & Mallick, 2010; Rueda et al., 2019; A. K. Singh et al., 2017). Las bacterias heterotróficas requieren grandes cantidades de carbono orgánico de origen vegetal lo que conlleva al uso de tierras cultivables; por lo tanto, una ventaja del uso de cianobacterias para la producción de PHA en comparación con las bacterias heterotróficas es que pueden utilizar CO<sub>2</sub> de la atmósfera como fuente de carbono. Si comparamos con los bioplásticos producidos a partir del maíz u otros recursos vegetales con el uso de cianobacterias para la producción de PHA es que se podrían evitar los conflictos éticos por el uso de tierras cultivables, ya que las cianobacterias podrían cultivarse en suelos no destinados a la agricultura como regiones desérticas (Rueda et al., 2019). Las deficiencias de nitrógeno y fósforo en el cultivo de cianobacterias incrementa la producción y acumulación de PHA, por lo tanto, se considera que un cultivo en dos

fases: una primera fase de crecimiento el cual incluye el medio de cultivo contiene todos los nutrientes necesarios para la producción de biomasa y una segunda fase de hambruna donde el medio de cultivo se encuentra deficiente en nutrientes como fósforo y nitrógeno (Bhati & Mallick, 2016; Panda, Sharma, & Mallick, 2005; Rueda et al., 2019). La ventaja distintiva del PHB cianobacteriano es su alta temperatura de fusión como la de *Spirulina platensis* de 192,9 °C y *Nostoc muscorum* de 176,0 °C es superior en comparación con las bacterias heterótróficas con 174,2 °C. También el PHB obtenido por *Nostoc muscorum* tiene un mayor porcentaje de alargamiento a la rotura de 8,6 % en comparación con las bacterias heterótróficas con 2,5 % (Yashavanth, Das, & Maiti, 2021). Una de las desventajas actuales, es que la producción de PHA empleando cianobacterias bajo fotoautotrofia es inferior al 9 % de su peso seco, ello representa una tasa muy baja en comparación con las bacterias heterótrofas que pueden llegar a producir entre 80 y 90 % de su peso seco (Rueda et al., 2019).

### **1.3.6 Factores que influyen en la producción de PHB en cianobacterias**

Existen diversos factores que regulan la biosíntesis de PHB en cianobacterias. Entre ellos se encuentran la deficiencia de nitrógeno y fósforo, los ciclos de luz y oscuridad, pH, presencia de fuentes de carbono orgánico, fuentes de carbono inorgánico y CO<sub>2</sub> (Sharma & Mallick, 2005). Según varios estudios relacionados, el aumento o variaciones de la intensidad de luz no parece afectar la acumulación de PHB (Rueda et al., 2019). El desencadenante más importante para la producción

de PHB es la deficiencia de nutrientes especialmente la deficiente de nitrógeno, fósforo y azufre (Troschl et al., 2018). La deficiencia de fósforo afecta la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa y presumiblemente no afecta la síntesis de NADPH durante la fotofosforilación que es la causa del aumento de la acumulación del PHB (Mallick, Sharma, & Kumar Singh, 2007). A pH alcalinos de 8,5 se encontró también que incrementa la producción de PHB; en contraste, la variación de pH no tiene ningún efecto con la producción de biomasa (Sharma & Mallick, 2005). Las fuentes de carbono reducido como azúcares y acetato promueven la síntesis de PHB y copolímeros de PHB-PHV obteniendo buenos resultados entre 40 a 70 % de su peso seco (Haase et al., 2012; Koller, 2015).

#### **1.4 Diodos emisores de luz y su efecto en la producción de biomasa y biomateriales**

Estudios anteriores han demostrado que las longitudes de onda de luz tienen efectos sobre la morfogénesis de las cianobacterias, su tasa de crecimiento y la biosíntesis de biomateriales (Mao & Guo, 2018; Pagels, Lopes, Vasconcelos, & Guedes, 2020; Schulze, Barreira, Pereira, Perales, & Varela, 2014). Los LED azul y rojo aumentaron la productividad de la biomasa en *Nannochloropsis sp.* y cultivo de *Botryococcus braunii*, respectivamente. La acumulación de lípidos aumentó en *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis sp.* y biomasa de *Chlorella vulgaris* cuando se utilizaron LED azul como fuente de energía en los cultivos (Prates et al., 2018). No se tienen estudios actualmente del efecto de longitudes de onda de luz en la producción de PHB en cultivos de cianobacterias.

### 1.5 Hipótesis y objetivo de la tesis

La hipótesis de esta tesis es que, las longitudes de onda de luz azul (470 nm), roja (660 nm) y verde (520 nm); afectan significativamente la cinética de producción de biomasa y acumulación de PHB con respecto al control en cultivos por lotes en una segunda fase de deficiencia de nutrientes a escala de laboratorio de la cianobacteria *Nostoc linckia*.

El objetivo general de esta tesis es determinar el efecto de longitudes de onda de luz azul (470 nm), roja (660 nm) y verde (520 nm); y de la deficiencia de fósforo, carbono y nitrógeno, en la producción de biomasa, PHB y morfología celular en una segunda fase a escala de laboratorio en cultivos de *Nostoc linckia*.

Los objetivos específicos son:

- 1) Caracterizar la cinética de crecimiento en el medio ES modificado en cultivos por lotes de *Nostoc linckia* a nivel de laboratorio.
- 2) Determinar el efecto de la deficiencia de carbono y fósforo en la producción de biomasa y PHB en cultivos por lotes de *Nostoc linckia*.
- 3) Determinar el efecto de longitudes de onda de luz azul (470 nm), roja (660 nm) y verde (520 nm); y de la deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono, en la producción de biomasa y morfología celular durante una segunda fase de cultivo por lotes.

## **2. EFECTO DE LONGITUDES DE ONDA DE LUZ Y DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, MORFOLOGÍA Y PHB EN CULTIVOS DE *Nostoc linckia***

### **2.1 Introducción**

Las cianobacterias que son capaces de fijar nitrógeno y acumular PHB, están siendo estudiadas en la última década, dado que puede crecer en condiciones deficientes de nitrógeno y fósforo, disminuyendo el costo de cultivos y producción de metabolitos de interés (Bhati & Mallick, 2016; Haase et al., 2012; Omar, Aly, Al-Malki, & Balkhair, 2016). La biomasa de microalgas es un recurso renovable que puede producirse sobre terreno no cultivable y la producción de PHA por microalgas ayudarían a reducir el impacto del uso de plásticos en el medio ambiente (Kumar & Kim, 2018). Las cianobacterias también son utilizadas como materia prima para la producción de antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, biopolímeros (PHB), colorantes, suplementos alimenticios, almidón, glucógeno y biodiesel (Park & Dinh, 2019). Las longitudes de onda de luz azul (470nm), roja (660nm) y verde (520nm) influyen tanto en la producción de biomasa como en la producción de metabolitos, sin embargo son escasos los estudios publicados hasta la fecha que estén centrados en este efecto (Park & Dinh, 2019). Por lo tanto, el efecto interactivo entre longitudes de onda de luz con la deficiencia de nutrientes en una segunda fase de cultivo por lote es un tema mucho menos estudiado. Un enfoque más estudiado es el efecto de la deficiencia de nutrientes; en especial el fósforo y nitrógeno como desencadenante de la biosíntesis de PHB y otros

metabolitos de interés (Rueda et al., 2019). En adición, en los últimos años se ha encontrado que la aplicación de ciclos repetitivos de carbono en el medio de cultivo mejora la acumulación de PHB y glucógeno debido a un crecimiento desequilibrado (Rueda et al., 2019). En cuanto a la deficiencia de fósforo, las cianobacterias tienden a almacenar fosfato en forma de polifosfatos y durante la escasez de fósforo estos organismos rompen estas cadenas para generar ATP (Panda et al., 2005). En la actualidad, no se ha estudiado el efecto interactivo entre las diferentes longitudes de onda de luz con la deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la producción de biomasa y acumulación de compuestos de interés durante una segunda fase de cultivo por lotes.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Medio de cultivo y condiciones de cultivo en *Nostoc linckia***

El medio de cultivo utilizado fue el medio Erddekot + Salze (ES) modificado. El medio de cultivo ES modificado presenta la siguiente composición:  $\text{NaHCO}_3$  (1 g/L),  $\text{KNO}_3$  (1,2 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,036 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,02 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g/L),  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,4 \times 10^{-2}$  g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,35 \times 10^{-2}$  g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \times 10^{-5}$  g/L),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1 \times 10^{-4}$  g/L),  $\text{H}_3\text{BO}_4$  ( $0,5 \times 10^{-4}$  g/L),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \times 10^{-5}$  g/L),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5 \times 10^{-5}$  g/L) y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $0,25 \times 10^{-7}$  g/L).

El medio ES original presenta en su composición extracto de suelo, se decidió eliminar este componente ya que la adición de extracto de suelo hace al medio de

cultivo complejo, difícil de evaluar las deficiencias de nutrientes. Además, de la posible presencia de algún inhibidor del crecimiento. Todos los experimentos fueron realizados en cultivos por lotes con agitación manual orbital dos veces al día cada 12 h, con una temperatura de incubación de 25 °C bajo luz continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blancas a una intensidad de  $45\pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### **2.2.2 Método de reactivación de la cianobacteria *Nostoc linckia***

Se utilizó una cepa de cianobacteria heterocistosa *Nostoc linckia* adquirida especialmente para este estudio desde el cepario del Grupo de Investigación Microalgal (FICOLAB) del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, caracterizada genéticamente. Para reactivar dicha cianobacteria, se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra líquida enviada al Laboratorio de Energías Renovables, LEER-UUC, el cual se pasó a un matraz de 500 mL conteniendo 200 mL de medio ES modificado el cual fue incubado a 25 °C bajo luz continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blanca con una intensidad de  $45\pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Después de 10 días de incubación, se obtiene un cultivo el cual se denominará cultivo madre para este trabajo.

### **2.2.3 Obtención de inóculo a partir del cultivo madre de *Nostoc linckia***

Se tomaron 30 mL del cultivo madre como inóculo para agregar a un matraz de 500 mL conteniendo 270 mL de medio de cultivo ES modificado con volumen final de trabajo de 300 mL. Este cultivo se incubó a 25 °C durante 10 días bajo luz

continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blanca con una intensidad de  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### **2.2.4 Método de cuantificación de biomasa seca**

El método utilizado para la cuantificación de la densidad celular fue mediante obtención de biomasa seca celular, ya que la particularidad de *N. linckia* es que tiende a aglomerarse, formar cadenas largas de células y cenobios que tienden a decantar, por lo tanto, los métodos de cuantificación de densidad mediante el seguimiento de su turbidez, por ensayos espectrofotométricos, o por recuento directo en cámara de Neubauer, no resultan adecuados.

Para obtener la biomasa seca del cultivo en un instante dado, se utilizó el siguiente protocolo:

- a) Se colocan los tubos de centrifuga de 50 mL en una estufa (Sartorius<sup>TM</sup> modelo MA35) a 70 °C por un periodo de 12 horas y luego se dejan enfriar y se pesa en una balanza analítica de 4 decimales (KERN modelo ABJ-NM) hasta verificar que el peso sea constante, esto con el objetivo de asegurar que los tubos de centrifuga no contengan rastros de humedad.
- b) Se obtiene un volumen conocido de cultivo, en este aspecto se tuvo que centrifugar todo el contenido en un matraz ya que tomar una muestra no es representativa por el motivo que *N. linckia* tiende a aglomerarse y decantar. Este volumen de cultivo se agita manualmente de forma orbital para desprender parte de la biomasa que se haya pegado en la superficie del matraz.

Luego, se procesa toda la biomasa del matraz, centrifugando todo el volumen en porciones de 40 mL en tubos de centrifuga de 50 mL a 6000 rpm por 10 minutos en una centrifuga (Hettich modelo Mikro220R), el sobrenadante de cada tubo es descartado.

- c) Los tubos que contienen las muestras son secados durante la noche destapados en una estufa a 70 °C, luego son retirados y colocados en un desecador durante 1 hora hasta que se enfríe.
- d) Por último, se pesa rápidamente en una balanza analítica de 4 decimales (KERN modelo ABJ-NM), hasta obtener peso constante.
- e) Para calcular la biomasa seca celular se obtiene mediante la diferencia del peso del tubo con la muestra seca (PTM) y el peso del tubo vacío (PTV) dividido por el volumen total centrifugado (VT), se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa seca (g/L)} = \frac{\text{PTM (g)} - \text{PTV (g)}}{\text{VT (L)}} \quad (1-1)$$

- f) Finalmente, se suman todos los pesos de biomasa seca que corresponden al todo el cultivo del matraz.

### **2.2.5 Método de cuantificación de PHB en biomasa seca mediante HPLC**

La cuantificación de PHB se realizó mediante hidrólisis ácida de las células del cultivo en materia seca, se pesó una muestra entre 2,5 a 3,5 de biomasa seca para

obtener ácido crotonico, mediante tratamiento con ácido sulfúrico de 5 mM, seguido de una detección UV a 215 nm, procedimiento detallado en el Anexo A. Para este procedimiento se utilizó un Thermo-Shaker marca Bioscan modelo TS-100 para una posterior medición por cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* HPLC (Aminex HPX-87H marca Jasco) acoplado a un detector UV (Serie 200, marca Jasco). Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibración de ácido crotonico que se encuentra en el Anexo B. Todo este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Cultivos Celulares I de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV.

## **2.3 Ensayos experimentales**

### **2.3.1 Determinación de la curva de crecimiento de *Nostoc linckia***

Se utilizó el método de cuantificación de la biomasa en base a peso seco con la finalidad de conocer las fases de crecimiento en un cultivo por lotes a nivel de laboratorio en matraces de 250 mL con 100 mL de volumen de trabajo. Ya que la cianobacteria *Nostoc linckia* crece formando cadenas de células que se aglomeran formando colonias con tendencia a precipitar, la medición de la biomasa se realizó por triplicado del cual se procesó todo el volumen de cultivo. Por lo tanto, para cada medición se tuvo que utilizar 3 matraces. Cada matraz contenía 90 mL de medio ES modificado que fueron inoculados con 10 mL de un cultivo de *Nostoc linckia* producido mediante el procedimiento de obtención de biomasa explicado en el inciso 2.2.3, con un volumen final de trabajo de 100 mL. Todos los matraces

se incubaron a 25 °C durante 25 días bajo luz continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blanco con una intensidad de luz de  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se realizaron muestreos aleatorizados por triplicado durante 25 días. Luego, para la obtención de biomasa seca se utilizó el procedimiento explicado en el inciso 2.2.4. Se realizaron 7 puntos de muestreo los cuales permitieron obtener el resultado de biomasa seca en g/L, estos resultados fueron representados en una curva de crecimiento y mostrando las barras de error por cada punto de muestreo.

Además, se midió la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *Nostoc linckia* mediante la siguiente fórmula:

$$\boxed{\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X} \quad (1-2)$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) y X es la biomasa celular seca en g/L.

### **2.3.2 Determinación del efecto de la deficiencia de carbono y fósforo en la acumulación de PHB en cultivo por lotes en *Nostoc linckia***

Los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día cada 12 horas. Para este experimento se consideraron tres tratamientos, se utilizó un solo matraz por tratamiento: el primero consistió en el control en un cultivo por lotes en medio ES modificado utilizando bicarbonato como fuente de carbono inorgánico; el segundo tratamiento fue un cultivo por lotes en medio ES modificado deficiente en la

fuelle de carbono inorgánico (ausencia de bicarbonato) y el tercer tratamiento consistió en un cultivo por lotes en medio ES modificado con deficiencia de la fuente de fósforo, donde el  $K_2HPO_4$  del medio fue reemplazado por una concentración equimolar de KCl. El periodo de incubación de los tratamientos fue de 6, 30 y 10 días respectivamente. Se utilizaron matraces de 250 mL los cuales fueron incubados a 25 °C bajo luz continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blanca con una intensidad de  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Después del tiempo de incubación, se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga (Hettich modelo Mikro220R), y se realizó el procedimiento de obtención de biomasa seca de cada tratamiento. Las muestras de biomasa seca se preservaron para su análisis de cuantificación de PHB mediante HPLC en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV. Con los resultados obtenidos se interpolaron a la curva de calibración de ácido crotónico que se encuentra en el ANEXO B. Para calcular la acumulación de PHB (%) dentro de la célula se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acumulación}_{\text{PHB}} = \frac{C_{\text{ácido crotónico}} (\text{mg/L})}{C_{\text{masa hidrolizada}} (\text{mg/L})} \cdot 100 \%$$

(1-3)

### **2.3.3 Determinación del efecto de longitudes de onda de luz en la producción de biomasa en cultivos de *Nostoc linckia***

Para este experimento se utilizaron 4 diferentes tratamientos con longitudes de onda de luz LED: luz blanca (control), azul (470nm), roja (660nm) y verde (520nm). Para ello se utilizaron tubos de luz LED tipo 5050, para la luz blanca; y tiras de luz LED 5050 para las luz verde, azul y roja de aproximadamente 30 cm de largo dispuestos en línea recta que iluminaban desde la parte superior a los matraces.

Para la primera fase, se utilizaron 16 matraces de 250 mL conteniendo 90 mL de medio ES modificado los cuales a cada uno se le inoculó 10 mL del cultivo de *N. linckia* con un volumen final de trabajo de 100 mL. Los matraces fueron incubados a 25 °C durante 10 días bajo luz continua 24:0, utilizando tubos de luces LED blanco con una intensidad de luz de  $45 \pm 5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Después del tiempo de incubación, se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga (Hettich modelo Mikro220R). La biomasa se resuspendió en 100 mL de medio de cultivo ES modificado estéril para iniciar con la segunda fase.

En la segunda fase del experimento, los matraces con la biomasa resuspendida, fueron incubados a 25 °C. Se formaron grupos de 4 matraces por tratamiento luz blanca (control), luz verde, luz azul y luz roja. Se realizó la medición de la biomasa seca en todo el volumen de un matraz por duplicado a los 4 días y a los 12 días de incubación por cada tratamiento. Finalmente se obtuvieron gráficos con barras de error de la producción de biomasa.

### 2.3.4 Determinación del efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la producción de biomasa y morfología en cultivos de *Nostoc linckia*

El medio de cultivo utilizado fue el medio Erddekot + Salze (ES) modificado. El procedimiento de preparación del medio ES modificado es detallado en el ANEXO C. Las condiciones ambientales de la habitación se mantuvieron mediante un equipo de aire acondicionado con monitoreo local permitiendo que la temperatura ambiente sea igual a  $25 \pm 1$  °C. El pH del medio fue de 8,0. La intensidad de luz blanca utilizada fue de  $45 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiada de forma continua de 24:0 (h:h). Cabe mencionar que de acuerdo a estudios previos, la intensidad de luz no afecta la producción de PHA, por lo que dicho factor se mantuvo constante durante todo el experimento (Monshupanee & Incharoensakdi, 2014; Rueda et al., 2019).

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado constituido por cuatro tratamientos y un grupo control en triplicado. Como variable de respuesta se estableció la producción de biomasa (g/L) y morfología. Los tratamientos fueron:

T<sub>1</sub>: Cultivo *N. linckia* + ES <sup>†</sup>N <sup>†</sup>P + luz blanca

T<sub>2</sub>: Cultivo *N. linckia* + ES <sup>†</sup>N <sup>†</sup>P + luz roja

T<sub>3</sub>: Cultivo *N. linckia* + ES <sup>†</sup>N <sup>†</sup>P + luz azul

T<sub>4</sub>: Cultivo *N. linckia* + ES <sup>†</sup>N <sup>†</sup>P <sup>†</sup>C + luz blanca

T<sub>control</sub>: Cultivo *N. linckia* + ES + luz blanca

Donde:

<sup>†</sup>N = medio cultivo deficiente en nitrógeno

<sup>†</sup>P = medio de cultivo deficiente en fósforo

<sup>†</sup>C= medio de cultivo deficiente en carbono (Rueda et al., 2019)

Los cultivos fueron realizados en matraces de 250 mL con 90 mL de medio de cultivo ES modificado. A cada matraz se agregó 10 mL de un cultivo de *N. linckia* en con una concentración de 0,224 g/L de biomasa seca como inóculo, haciendo una concentración final de 0,0224 g/L de biomasa seca.

La agitación se realizó manualmente dos veces por día cada 12 horas para favorecer el intercambio de gases y disminuir la aglomeración celular. Al cabo de 10 días, el cultivo se centrifugó en tubos de centrífuga de 50 mL con fondo cónico de polipropileno estériles a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga (Hettich modelo Mikro220R). La biomasa obtenida se resuspendió en medio ES modificado estéril correspondiente a cada tratamiento indicado en el diseño experimental como forma de lavado, se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga (Hettich modelo Mikro220R). La biomasa lavada fue resuspendida en 100 mL de medio ES modificado estéril según corresponda al tratamiento. Este procedimiento fue realizado a cada uno de los matraces del experimento. Luego los matraces fueron incubados en las condiciones mencionadas en el diseño experimental a  $25 \pm 1$  °C y fotoperiodo de 24:00 (h:h) por 8 días.

Después del tiempo de incubación en condiciones deficiente de nutrientes, se tomaron 50 uL de muestra por cada cultivo para realizar observaciones microscópicas en fresco en un microscopio (Motic serie BA310) a un aumento de 400x para caracterizar la morfología celular. Luego se cosechó la biomasa

mediante centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga (Hettich modelo Mikro220R) y se realizó el procedimiento para obtener biomasa seca. La biomasa seca fue pesada y reservada.

### **2.3.5 Análisis estadístico**

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) a los tratamientos. También se realizó la prueba DUNCAN para la comparación de medias, obtener diferencias significativas entre tratamientos y obtención de grupos homogéneos con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$  con el programa IBM SPSS statistic versión 22. Esta prueba se realizó en el experimento 2.3.3 y el experimento 2.3.4.

## 2.4 Resultados y discusión

### 2.4.1 Curva de crecimiento de *N. linckia* en medio ES modificado

En la Figura 2-1 se observa el crecimiento de *Nostoc linckia* en un cultivo por lotes, la mayor producción de biomasa resultó en el día 7 de cultivo con un promedio de 0,175 g/L de biomasa seca celular.

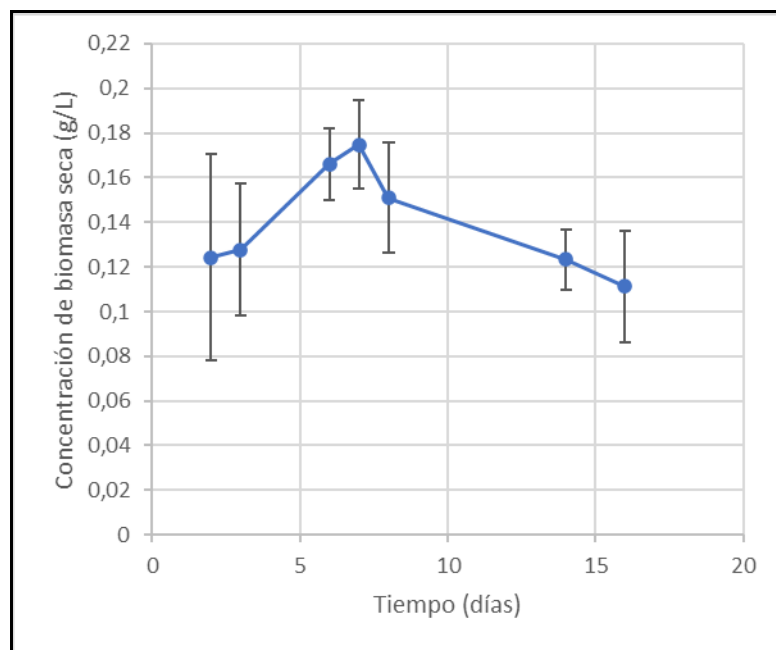


Figura 2-1: Curva de crecimiento de *Nostoc linckia* en el medio ES modificado en cultivo por lotes

Los valores obtenidos en la curva de crecimiento no alcanzaron ni un tiempo de duplicación e incluso disminuyó la biomasa al día 7. Esto hace suponer que se produjo una inhibición del crecimiento por deficiencia de algún nutriente o por la

presencia de algún inhibidor. También, cabe la posibilidad que durante la adaptación de la cianobacteria en estudio en el medio ES modificado no fue lo suficientemente adecuado. La forma de cultivo en matraces donde se tuvo que cosechar todo el volumen del cultivo conllevó a un rango de error mucho mayor.

Mediante la aplicación de la Fórmula (1-2) se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) igual a  $0,00328 \text{ h}^{-1}$  ( $0,079 \text{ d}^{-1}$ ). Este resultado fue muy bajo en comparación con lo obtenido por Bhati y Mallick (2016) los cuales cultivaron a *Nostoc muscorum* a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  con  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad de luz utilizando lámparas fluorescentes de luz blanca en el medio BG-11 bajo un fotoperiodo de 14:10 sin proporcionar aireación ni  $\text{CO}_2$ , del cual se obtuvieron una tasa de crecimiento de  $\mu=0,18 \text{ d}^{-1}$ . Además, el tiempo en que alcanzo *Nostoc linckia* la máxima producción de biomasa fue a los 7 días, en cuanto al trabajo realizado por Omar, Aly, Al-Malki, y Balkhair (2016) *Nostoc linckia* alcanzó su máxima producción de biomasa de  $1,03 \text{ g/L}$  en medio BG-11 a los 14 día de incubación a pH 7, con  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  aplicando  $3000 \text{ lux}$  de intensidad de luz utilizando una fuente de luz blanca fluorescente. Si bien la intensidad de luz fue similar al utilizado en el presente trabajo queda claro que es importante realizar cultivos sucesivos en el medio de cultivo ES modificado para permitir una adaptación eficiente en el nuevo medio de cultivo.

#### 2.4.2 Efecto de la deficiencia de fósforo y carbono en la producción de biomasa y acumulación de PHB en cultivos de *Nostoc linckia*

En la Tabla 2-1 se muestra la producción de biomasa en mg/L y acumulación de PHB en % en los tratamientos en cultivos por lotes de *Nostoc linckia*. El tratamiento que contenía bicarbonato acumuló PHB con 0,171 %. El tratamiento deficiente en bicarbonato obtuvo una acumulación de PHB (%) de 0,668 %. Finalmente, el tratamiento con bicarbonato y deficiente en fósforo obtuvo una acumulación de PHB 0,356 %.

Tabla 2-1: Efecto del bicarbonato y deficiencia de fósforo en la acumulación de PHB (% biomasa seca) en cultivos por lotes de *Nostoc linckia*

MUESTRA	Tiempo incubación (días)	Biomasa seca (mg/L)	% PHB (% biomasa seca)
ES con bicarbonato	6	53,3	0,171
ES deficiente en bicarbonato	30	87,9	0,668
ES con bicarbonato deficiente en fósforo	10	106,0	0,356

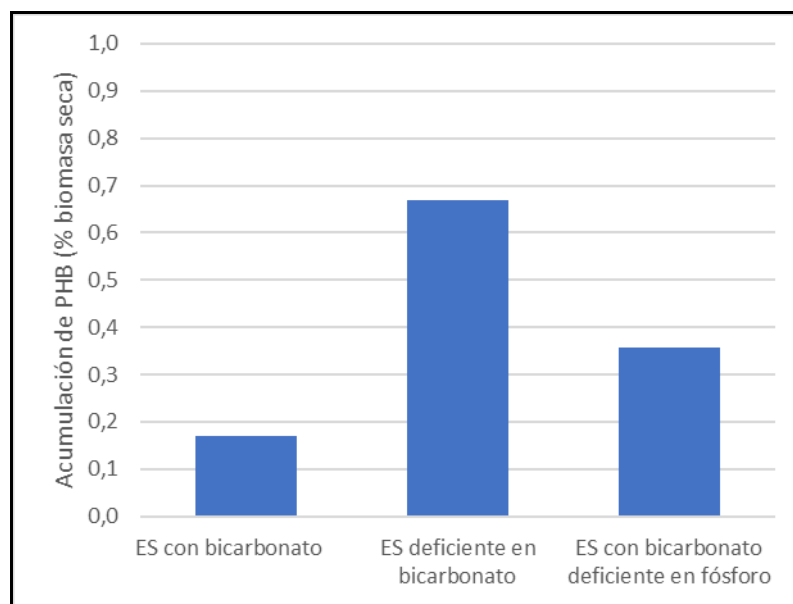


Figura 2-2: Efecto del bicarbonato y deficiencia del fósforo en cultivos por lotes de *Nostoc linckia* en la acumulación de PHB (%).

En este experimento se quiso evaluar el efecto de una fuente de carbono inorgánico (bicarbonato) y de la deficiencia de fósforo en la producción de biomasa y acumulación de PHB. No se logró obtener una acumulación significativa en los tratamientos para poder comparar los resultados. La acumulación de PHB está directamente relacionada a la producción de biomasa al no obtener buena cantidad de biomasa, repercutió en la acumulación de PHB de forma negativa e incluso a valores dentro del rango de errores analíticos. Estos resultados se pueden comparar con el trabajo realizado por Bhati et al. (2010) el cual utilizó el medio BG11. Este medio carece de bicarbonato, pero presenta carbonato como fuente inorgánica de carbono, con un pH de 7,4. En dicho trabajo se realizó el cultivo de *Nostoc linckia* a  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz con un

fotoperiodo de 14:10 de luz:oscuridad, obteniendo 3,5 % PHB (%biomasa seca) a los 14 días de incubación. Los resultados de PHB obtenidos en el presente trabajo también pueden contrastarse a los obtenidos por Ansari y Fatma (2016) con 20 cepas que lograron acumular PHB entre 0,51% en *Spirulina platensis* hasta 6,44% en *Nostoc muscorum*. Se reportan valores de acumulación de PHB menores al 1 %. Para ver la diferencia de la producción de PHB en tratamientos, se determinó la acumulación de PHB (%). Todos los tratamientos obtuvieron una acumulación de PHB baja en los cultivos de *Nostoc linckia*. A pesar de ello, el motivo del uso del bicarbonato en el medio de cultivo además de proveer una fuente de carbono para la producción de biomasa también produce un aumento en el pH del medio de cultivo hasta un valor aproximado de 8. Se sabe que en anteriores estudios realizados por Sharma y Mallick (2005), determinaron que un aumento significativo del pH en un medio de cultivo alcalino mejora la acumulación de PHB. Ciertamente, valores más elevados del pH afectan el equilibrio del CO<sub>2</sub> hacia el ión bicarbonato, lo que podría explicar porque ayuda a acumular PHB. Además, de acuerdo con anteriores estudios, la deficiencia de fósforo en los cultivos permite mejorar la acumulación de PHB que serviría como reserva de carbono para sintetizar los componentes necesarios para la recuperación del crecimiento fotoautotrófico. Un claro ejemplo de este fenómeno fue el mostrado por Bhati y Mallick (2015) en el cual mejoraron la producción del copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)) mediante deficiencia de nitrógeno y fósforo en cultivos de *Nostoc muscorum*. En el trabajo realizado por Omar, Aly, Al-Malki, y Balkhair (2016), estudiaron el efecto del pH,

deficiencia de Nitrógeno y deficiencia de fósforo en cultivos de *Nostoc linckia* encontraron que el pH óptimo para estimular la producción de PHB fue de pH 8, en cuanto al efecto de la deficiencia de fósforo obtuvo mejores resultados que el efecto de la deficiencia de Nitrógeno a 20.36 % y 15,67 % de PHB (% biomasa seca), respectivamente. En cultivos por lotes a los 14 días de incubación.

Otros trabajos también mencionan que la acumulación de compuestos de interés como los lípidos, pigmentos, glucógeno, y biopolímeros como el PHB, están relacionados a la disminución de la biomasa (Duarte et al., 2019); por lo tanto, fue necesario realizar un cultivo en dos fases para evaluar el efecto de las deficiencias y longitudes de onda de luz.

Con respecto al análisis de cuantificación por HPLC de PHB utilizado en este trabajo por cuantificación del ácido crotonico generado, su espectro de absorción muestra una correspondencia directa con el PHB, pero no con otros PHA, de modo que podría haberse subestimado la cantidad total reportada.

#### **2.4.3 Efecto de diferentes longitudes de onda en una segunda fase de cultivo en la producción de biomasa de *Nostoc linckia***

En la Tabla 2-2 se muestra el promedio de los tratamientos a los 4 días de incubación donde el tratamiento con mayor producción de biomasa fue el tratamiento ES Control con una media de 0,1512 g/L de biomasa seca. De acuerdo

con el análisis de comparación de medias DUNCAN se observan tres grupos homogéneos.

Tabla 2-2: Efecto de diferentes longitudes de onda de luz en la producción de biomasa a los 4 días de incubación

Tratamientos	Repetición		Promedio (g/L)	Desviación estándar	Grupos homogéneos
	I (g/L)	II (g/L)			
<b>ES Control</b>	0,1650	0,1375	0,1513	0,01944	a
<b>ES luz roja</b>	0,0600	0,1125	0,0863	0,03712	b
<b>ES luz azul</b>	0,0500	0,0550	0,0525	0,00354	bc
<b>ES luz verde</b>	0,0075	0,0100	0,0088	0,00177	c

En la Tabla 2-3, se muestra el promedio de los tratamientos a los 12 días de incubación donde el tratamiento con mayor producción de biomasa fue el tratamiento ES Control con una media de 0,2479 g/L de biomasa seca. De acuerdo con el análisis de comparación de medias DUNCAN se observan dos grupos homogéneos. El primer grupo (a) que corresponden a los tratamientos con mayor producción de biomasa no presentan diferencias significativas, estos son el tratamiento ES control el cual se utilizó la luz LED blanca y el tratamiento ES luz roja que utilizó la luz LED roja. El segundo grupo (b) que corresponden a los tratamientos ES luz azul el cual se utilizó la luz LED azul y el tratamiento ES luz verde que utilizó la luz LED verde, no presentan diferencias significativas entre sí.

Tabla 2-3: Efecto de diferentes longitudes de onda de luz en la producción de biomasa a los 12 días de incubación

Tratamientos	Repetición		Promedio (g/L)	Desviación estándar	Grupos homogéneos
	I (g/L)	II (g/L)			
<b>ES Control</b>	0,2829	0,2129	0,2479	0,049497	a
<b>ES luz roja</b>	0,2300	0,2114	0,2207	0,013152	a
<b>ES luz azul</b>	0,0686	0,0600	0,0643	0,006081	b
<b>ES luz verde</b>	0,0486	0,1200	0,0843	0,050487	b

En la Figura 2-3, se muestra en resumen el efecto de la luz blanca, roja, azul y verde en cultivos por lotes a los 4 días y 12 días. Con la luz verde y luz azul no produjo una producción de biomasa considerable. Con la luz roja produjo una media de producción de biomasa de 0,2207 g/L el cual no presenta diferencia significativa con el tratamiento es control que presentó una media de producción de biomasa de 0,2479 g/L.

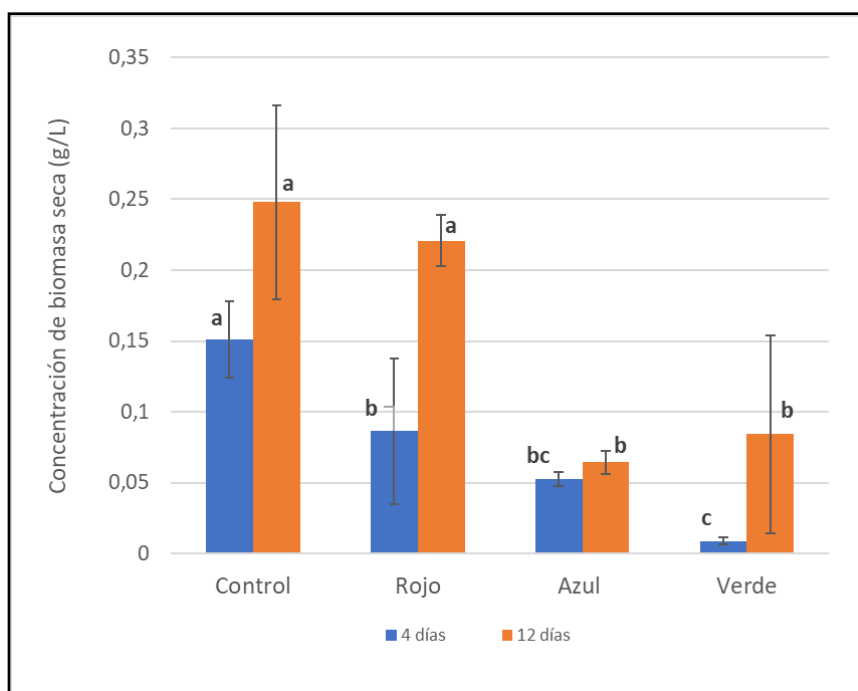


Figura 2-3: Efecto de longitudes de onda de luz azul (470nm), roja (660nm) y verde (520nm) en la producción de biomasa de *Nostoc linckia*.

Se conoce que los principales pigmentos fotosintéticos presentes en la cianobacterias son capaces de absorber energía en longitudes de onda de 430 y 680 nm (clorofila a) y bandas de 550 y 620 nm (ficobiliproteínas) (Prates et al., 2018). A los 12 días de incubación se observa que los cultivos que utilizaron como fuente de energía luz LED blanca y luz LED roja mostraron concentraciones de biomasa más altas ( $p < 0,05$ ) que al utilizar luz LED verde y LED azul. Este resultado fue explicado por Prates et al. (2018), quien mencionó que los LED rojo cubren el espectro de absorción de luz de los pigmentos (620-645nm) lo que conlleva a una mayor absorción o utilización de energía y por ende mayor producción de biomasa. La biomasa está relacionada a la producción de proteínas por lo tanto se

puede deducir que la luz LED roja está implicada en la síntesis de proteínas para mantener la multiplicación celular y producción de biomasa (Prates et al., 2018).

Haciendo un análisis del trabajo realizado por Park y Dinh (2019) en *Arthrospira maxima*, determinaron que la luz LED azul produce niveles altos de ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina), la luz LED roja produce niveles más elevados de clorofila a, y la combinación de ambas luz LED produce un aumento en la biomasa y clorofila a. Este resultado demuestra que el efecto de la luz LED roja mejora la producción de biomasa similar a lo obtenido en el presente trabajo.

#### 2.4.4 Efecto de longitudes de onda de luz, deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en una segunda fase de cultivo en la producción de biomasa en *Nostoc linckia*

Durante la segunda fase de deficiencia de nutrientes está relacionado a la acumulación de compuestos de interés. Por ejemplo, la deficiencia de fósforo disminuye el flujo del carbono hacia el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT) e incrementa la acumulación de PHB, lípidos y glucógeno.

En la Tabla 2-4 se observan las medias y grupos homogéneos por tratamiento del efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de N, P y C en la producción de biomasa. En este experimento se observa que el control y el tratamiento deficiente en nitrógeno y fósforo se encuentran en un grupo homogéneo, por lo que ambos tratamientos no presentan diferencias significativas. La media de producción de biomasa del tratamiento ES control 0,259 g/L y la media de producción de biomasa del tratamiento ES deficiente en nitrógeno y fósforo es de 0,238 g/L.

Tabla 2-4: Grupos homogéneos entre tratamientos del efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de N, P, y C en la producción de biomasa.

Tratamiento	Repetición			Promedio (g/L)	Desviación estándar	Grupos homogéneos
	I (g/L)	II (g/L)	III (g/L)			
ES Control	0,307	0,223	0,247	0,259	0,04327	a
ES <sup>+</sup> N P	0,212	0,229	0,273	0,238	0,03148	a
ES <sup>+</sup> N P C	0,098	0,084	0,081	0,088	0,00907	b
ES <sup>+</sup> N P Rojo	0,17	0,119	0,125	0,138	0,02788	b
ES <sup>+</sup> N P Azul	0,101	0,094	0,108	0,101	0,007	b

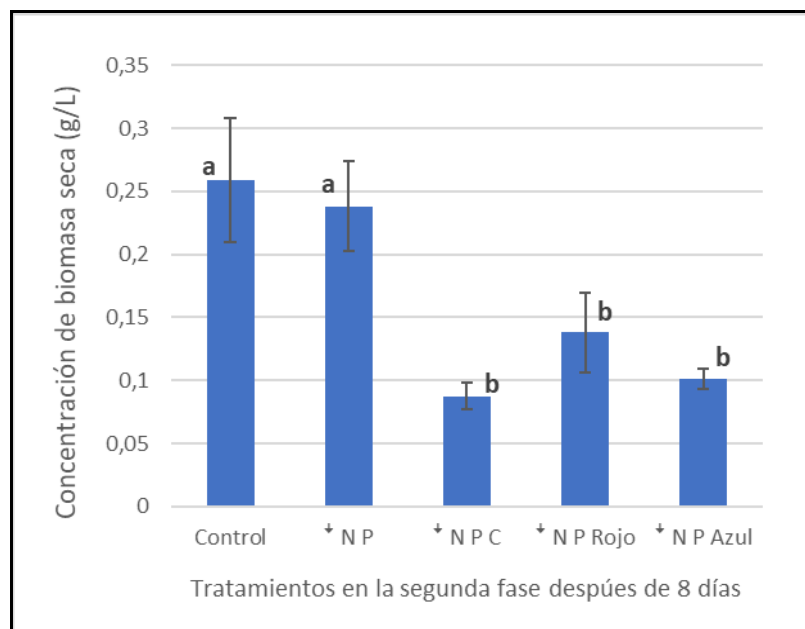


Figura 2-4: Efecto de la deficiencia de nitrógeno, fósforo, carbono, luz azul (470nm) y roja (660nm) en la producción de biomasa.

En la Figura 2-4 se observa el efecto de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en la producción de biomasa el cual no presenta diferencias significativas con el control. Esto se debe a que la cianobacteria *Nostoc linckia* tiende a acumular fosfatos en organelos especializados como polifosfatos, los cuales lo más probable fueron utilizados en esta segunda fase de deficiencia de nutrientes. Adicionalmente, esta cianobacteria es capaz de fijar nitrógeno mediante los heterocistos, por lo tanto, esto podría explicar en parte el resultado. Además, en los resultados del experimento del Enunciado 2.3.3, en el que se evalúa el efecto de la longitud de onda de la luz roja en la producción de biomasa, se obtiene que es similar a la del control sin diferencias significativas. En contraste, cuando se evaluó el efecto de la luz roja y deficiencia de nitrógeno y fósforo a la vez, se observó que ambos

afectan negativamente en la producción de biomasa, resultando en diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo hace pensar que existe un efecto acumulativo entre las longitudes de onda monocromáticas y las deficiencias de fuentes de nitrógeno y fósforo que afectan negativamente en la producción de biomasa. Esto lo podemos explicar con otros estudios los cuales son escasos sobre el efecto interactivo entre longitudes de onda de luz y deficiencia de nutrientes en microalgas y menos aún en cianobacterias. Por ejemplo, un estudio realizado en la microalga verde *Dunaliella sp.* por Pereira y Otero (2019), en el que utilizaron diferentes longitudes de onda de luz azul, roja y combinación de azul y roja junto a deficiencia de nitrógeno, en el día 3 de cultivo por lotes observaron que el efecto interactivo de ambos produce diferentes resultados en la producción de pigmentos. En la investigación realizada por Han et al. (2015) utilizaron una cepa de *Nostoc flageliforme* cultivada en medio BG-11 bajo luz continua de luz blanca, roja, azul, verde, púrpura y amarilla para analizar la tasa de la actividad fotosintética y los metabolitos intracelulares. En cuanto a la tasa de actividad fotosintética se obtuvo una mayor tasa fotosintética en la luz monocromática roja. En segundo lugar, el análisis de metabolitos fue realizado para un estudio más detallado de los metabolitos del ciclo del ácido tricarbóxico (CAT). En dicho estudio se encontró que las luces monocromáticas cambiaron significativamente el metabolismo de las células, observándose una reducción en los niveles de la mayoría de los metabolitos del CAT (citrato, fumarato y succinato).

Se sabe que el CAT se utiliza para proporcionar a la célula energía y precursores biosintéticos para la producción de aminoácidos. Entre ellos, los más importantes

en el proceso de fijación de nitrógeno incluyen glutamina y glutamato (Han et al., 2015). Ambos aminoácidos están implicados en la fijación biológica del nitrógeno específicamente en el ciclo GS-GOGAT. Por lo tanto, una explicación al efecto interactivo negativo del uso de diferentes longitudes de onda de luz y deficiencia de nitrógeno en la producción de biomasa es que durante la deficiencia de nitrógeno se estimula la producción de heterocistos y se activan las enzimas de fijación de nitrógeno, única vía para síntesis de proteínas, que en cianobacterias depende directamente del esqueleto carbonatado del ciclo CAT.

#### 2.4.5 Efecto de longitudes de onda de luz azul, rojo y verde en la morfología microscópica en cultivos de *Nostoc linckia*

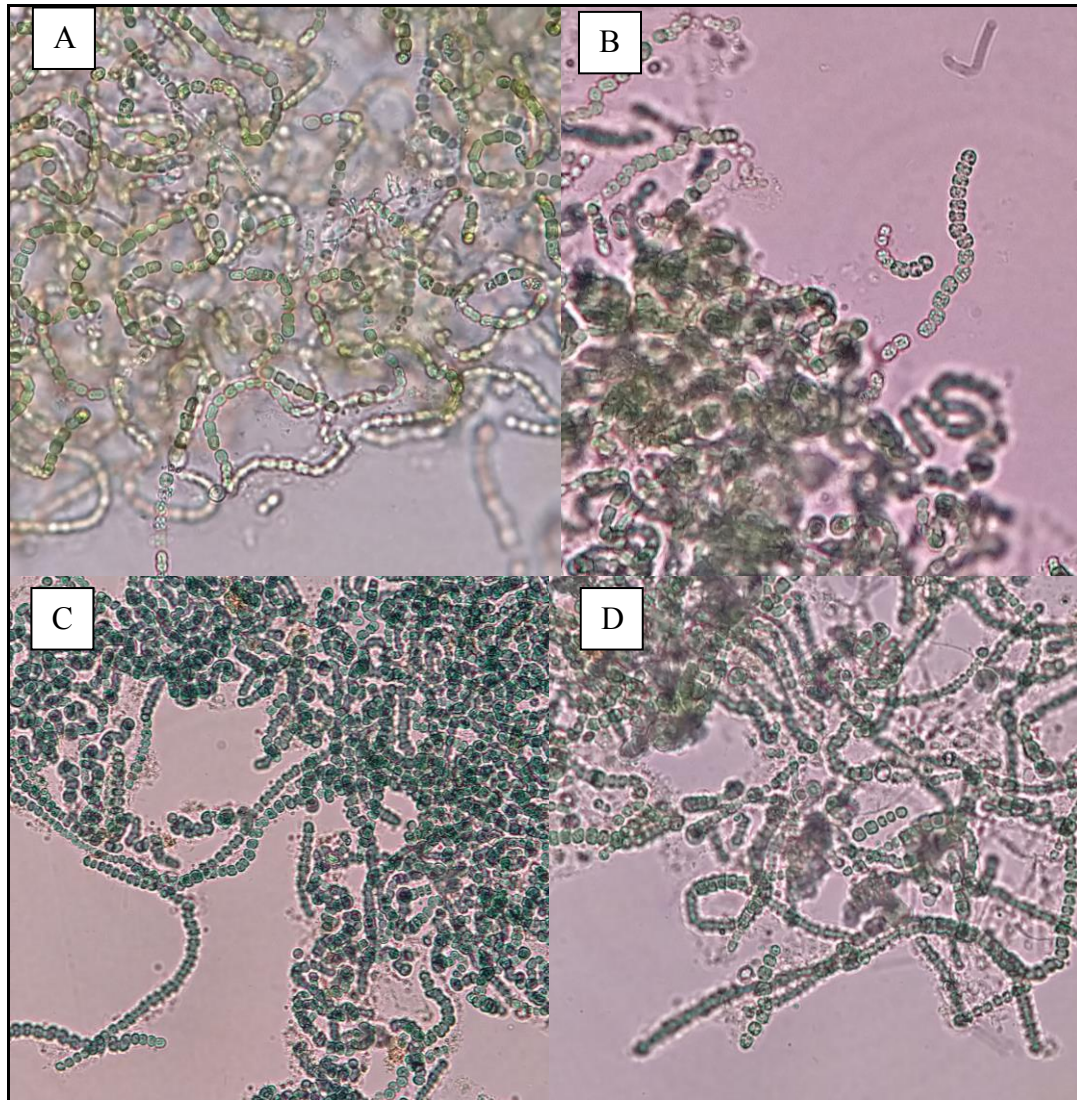


Figura 2-5: Observación microscópica en fresco a mayor aumento (400X) en un microscopio (Motic serie BA310) del cultivo de *Nostoc linckia*: (A) Tratamiento control luz LED blanca, (B) Tratamiento con luz LED roja (660nm), (C) Tratamiento con luz LED azul (470nm) y (D) Tratamiento con luz LED verde (520nm).

Se han estudiado la presencia de inclusiones granulares en cianobacterias los cuales están relacionados a la acumulación de gotitas de lípidos neutros, glucógeno, péptidos no ribosomales, polisacáridos, polifosfatos y PHA (Hong et al., 2021). En la Figura 2-5 se muestran las observaciones microscópicas de los cultivos de *Nostoc linckia* por cada tratamiento. En el caso del control irradiado con luz LED blanca se observan pocos gránulos de inclusiones en comparación con los cultivos con luz LED roja, que presentaron mayor densidad de gránulos, además de una morfología diferente con células más aplanadas; lo mismo ocurre con cultivos con luz LED azul, aunque la cantidad de gránulo, resaltando el color verde azulado de las cadenas de células este color está relacionado a la acumulación de ficocianinas.

**2.4.6 Efecto de longitudes de onda de luz y deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono en la morfología microscópica de *Nostoc linckia***

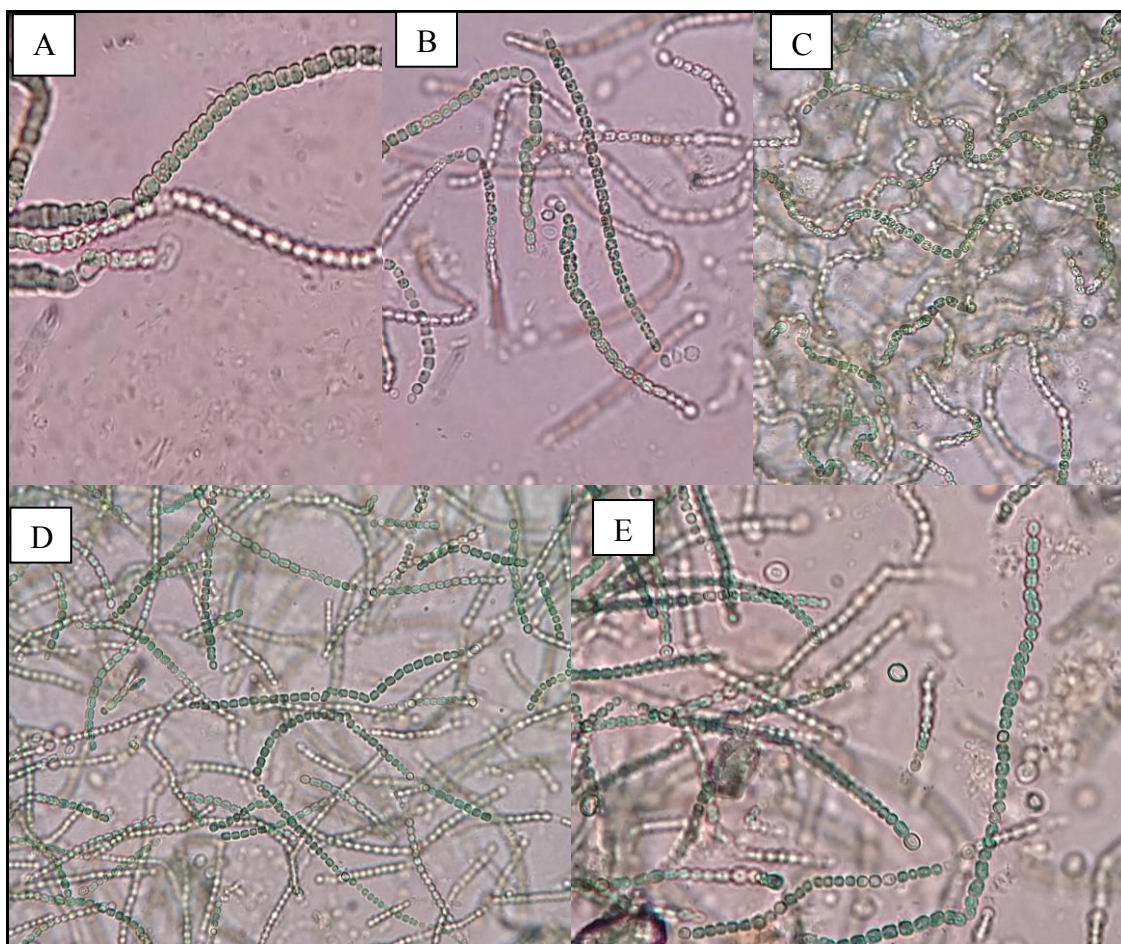


Figura 2-6: Observación microscópica en fresco a mayor aumento (400X) en un microscopio (Motic serie BA310) del cultivo de *N. linckia*: (A) Tratamiento control con medio ES, (B) Tratamiento deficiente en N y P, (C) Tratamiento deficiente en N, P y C, (D) Tratamiento deficiente en N y P con luz LED rojo (660nm) y (E) Tratamiento deficiente en N y P con luz LED azul (470nm).

En la Figura 2-6 se observa el efecto interactivo de la deficiencia de nitrógeno, fósforo y carbono, con el efecto que produce la longitud de onda de luz monocromática en la morfología microscópica. Lo más resaltante de las observaciones microscópicas indican que con los tratamientos con luz blanca (tratamiento control, tratamiento deficiente de nitrógeno y fósforo y tratamiento deficiente en nitrógeno, fósforo y carbono) presentan inclusiones intracelulares abundantes, lo que hacen que la célula se ensanche, presentando tricomas con forma más sinuosa y mayor frecuencia de presencia de heterocistos terminales e intercalares. Lo contrario se observa en los tratamientos donde se utilizaron luz LED monocromática (roja y azul) con deficiencia en nitrógeno y fósforo, en los que se observan pocos o ningún gránulo intracelular; la forma de las células resultó ser más alargada, sin deformaciones, con tricomas más cortos de forma más uniforme con heterocistos terminales y escasos.

Este resultado permite deducir que existe un efecto interactivo entre las longitudes de onda de luz junto con la deficiencia de nutrientes en la morfología microscópica ya descrita anteriormente, ha resultado ser muy diferente que cuando se utiliza luz monocromática en los cultivos, solamente.

Un objetivo anteriormente planteado del presente trabajo fue determinar el efecto de acumulación de PHB en una segunda fase de cultivo mediante el efecto producido por longitudes de onda de luz, como por la deficiencia de nutrientes, esto no se llevó a cabo por motivo del estallido social ocurrido en el país de Chile y después por el inicio de la pandemia del COVID-19 que restringió el uso de laboratorios. Es por ello, por lo que el efecto producido por las diferentes

longitudes de onda de luz como de la deficiencia de nutrientes pueden ser evaluados de forma alternativa mediante la presencia, ausencia de inclusiones o gránulos en las células para ver si existe un efecto en la acumulación de productos de interés como también en la producción de biomasa. Esta actividad se propone como un breve trabajo experimental subsecuente.

## 2.5 Conclusiones

Se determinó que las longitudes de onda de luz azul (470 nm), roja (660 nm) y verde (520 nm); y la deficiencia de fósforo, carbono y nitrógeno, afectan significativamente la cinética de producción de biomasa; así como, de la morfología celular en cultivos por lotes a escala de laboratorio de la cianobacteria *Nostoc linckia*.

El crecimiento de *Nostoc linckia* en el medio de cultivo ES modificado obtuvo un máximo de biomasa de 0,175 g/L, y una tasa de crecimiento de ( $\mu$ ) igual a 0,00328 h<sup>-1</sup> (0,079 d<sup>-1</sup>) estos resultados no fueron determinantes del comportamiento de la cianobacteria en dicho medio.

Se determinó que el efecto de la deficiencia de fósforo y carbono inorgánico en la acumulación de PHB en el medio ES modificado en cultivos por lotes de *Nostoc linckia* no fueron significativos. Los resultados de acumulación de PHB (% biomasa seca) en los tratamientos fueron muy bajos dentro del margen de variaciones analíticas.

Se determinó que las longitudes de onda de luz azul (470nm) y verde (520nm) afectan significativamente la producción de biomasa disminuyéndola en comparación con el control luz LED blanca a 0,0643 g/L y 0,043 g/L, respectivamente. También, se determinó que la luz LED roja (660 nm) no afecta

significativamente la producción de biomasa con 0,2479 g/L en comparación con el control luz LED blanca con 0,2207 g/L a los 12 días de incubación en una segunda fase de cultivo. Además, las longitudes de onda de luz y el tratamiento control con luz LED blanca afectaron la morfología microscópica en forma y color en los cultivos de *Nostoc linckia*

Se determinó que la deficiencia de nitrógeno y fósforo en el cultivo de *N. linckia* no afecta la producción de biomasa con 0,238 g/L en comparación con el control con 0,259 g/L de producción de biomasa. Se determinó que el tratamiento deficiente en nitrógeno y fósforo, con luz LED roja o luz LED azul, afecta negativamente la producción de biomasa con 0,138 g/L y 0,101 g/L, respectivamente, en comparación con el control con luz LED blanca con una producción de biomasa de 0,259 g/L. También, se determinó que el tratamiento con deficiencia en nitrógeno, fósforo y carbono afecta significativamente la producción de biomasa disminuyéndola hasta en un 0,088 g/L en comparación con el control, además de producir un incremento en la producción de inclusiones.

## REFERENCIAS

Alvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M., & Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, Vol. 54, p. 102200. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>

Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>

Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). Carbon Acquisition by Microalgae. In *The Physiology of Microalgae* (pp. 89–99). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_4)

Bhati, R., & Mallick, N. (2015). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. *Algal Research*, 7, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.003>

Bhati, R., & Mallick, N. (2016). Carbon dioxide and poultry waste utilization for production of polyhydroxyalkanoate biopolymers by *Nostoc muscorum* Agardh: a sustainable approach. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 161–168.

<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0573-x>

Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., & Mallick, N. (2010). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. *Biotechnology Journal*, 5(11), 1181–1185. <https://doi.org/10.1002/biot.201000252>

Bruder, U. (2019). Bioplastics and Biocomposites. In *User's Guide to Plastic* (pp. 59–69). <https://doi.org/10.3139/9781569907351.006>

Carr, N. G. (1966). The occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. *BBA - Biophysics Including Photosynthesis*, 120(2), 308–310. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(66\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90353-0)

Che, C. A., Kim, S. H., Hong, H. J., Kityo, M. K., Sunwoo, I. Y., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2019). Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system. *Bioresource Technology*, 285, 121323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121323>

Costa, S. S., Miranda, A. L., de Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>

Duarte, J. H., de Souza, C. O., Druzian, J. I., & Costa, J. A. V. (2019). Light emitting diodes applied in *Synechococcus nidulans* cultures: Effect on growth, pigments production and lipid profiles. *Bioresource Technology*, 280, 511–514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.009>

European Bioplastics (2020). Bioplastics market data. from <https://www.european-bioplastics.org/>

Fu, W., Guomundsson, Ó., Paglia, G., Herjólffsson, G., Andrésson, Ó. S., Pálsson, B. O., & Brynjólffsson, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2395–2403. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5>

Fu, Y., Chen, T., Chen, S. H. Y., Liu, B., Sun, P., Sun, H., & Chen, F. (2021). The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.050>

Gatamaneni, B. L., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2018). Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species. *Environmental Engineering Science*, 35(10), 1037–1048. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0521>

Haase, S. M., Huchzermeyer, B., & Rath, T. (2012). PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 157–162. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9663-6>

Han, P. P., Shen, S. G., Wang, H. Y., Sun, Y., Dai, Y. J., & Jia, S. R. (2015). Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Algal Research*, 9, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.019>

Hong, K., Beld, J., Davis, T. D., Burkart, M. D., & Palenik, B. (2021). Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria. *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/jpy.13123>

Iijima, H., Watanabe, A., Sukigara, H., Iwazumi, K., Shirai, T., Kondo, A., & Osanai, T. (2021). Four-carbon dicarboxylic acid production through the reductive branch of the open cyanobacterial tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolic Engineering*, 65, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.03.007>

Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, Vol. 24, pp.

237–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>

Koller, M. (2015). Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoate Production: Status Quo and Quo Vadis? *Current Biotechnology*, 4(4), 464–480. <https://doi.org/10.2174/2211550104666150917010849>

Kumar, P., & Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269(July), 544–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

Kwan, P. P., Banerjee, S., Shariff, M., & Md. Yusoff, F. (2021). Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research*, 52(4), 1337–1347. <https://doi.org/10.1111/are.15023>

Mallick, N., Sharma, L., & Kumar Singh, A. (2007). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum*: Effects of metabolic inhibitors. *Journal of Plant Physiology*, 164(3), 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.01.012>

Mao, R., & Guo, S. (2018). Performance of the mixed LED light quality on the growth and energy efficiency of *Arthrospira platensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5245–5254. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8923-7>

Mishra, A. K., Kaushik, M. S., & Tiwari, D. N. (2019). Nitrogenase and

Hydrogenase: Enzymes for Nitrogen Fixation and Hydrogen Production in Cyanobacteria. In *Cyanobacteria* (pp. 173–191). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00008-8>

Mock, M., Schmid, A., & Bühler, K. (2019). Photoautotrophic production of succinate via the oxidative branch of the tricarboxylic acid cycle influences glycogen accumulation in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Algal Research*, 43, 101645. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101645>

Monshupanee, T., & Incharoensakdi, A. (2014). Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 830–838. <https://doi.org/10.1111/jam.12409>

NCBI Taxonomy. (2021) from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53758/>

Niaounakis, M. (2013). Definitions and Assessment of (Bio)degradation. In *Biopolymers Reuse, Recycling, and Disposal* (pp. 77–94). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-3145-9.00002-6>

Omar, H. H., Aly, M. M., Al-Malki, W. J., & Balkhair, K. S. (2016). Production and enhancement of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in cyanobacteria. *Main Group Chemistry*, 15(2), 153–161. <https://doi.org/10.3233/MGC-150194>

Pagels, F., Lopes, G., Vasconcelos, V., & Guedes, A. C. (2020). White and red LEDs as two-phase batch for cyanobacterial pigments production. *Bioresource Technology*, *307*, 123105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123105>

Panda, B., Sharma, L., & Mallick, N. (2005). Poly-b-hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. *Journal of Plant Physiology*, *162*, 1376–1379. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.002>

Park, J., & Dinh, T. B. (2019). Contrasting effects of monochromatic LED lighting on growth, pigments and photosynthesis in the commercially important cyanobacterium *Arthrospira maxima*. *Bioresource Technology*, *291*, 121846. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121846>

Pereira, S., & Otero, A. (2019). Effect of light quality on carotenogenic and non-carotenogenic species of the genus *Dunaliella* under nitrogen deficiency. *Algal Research*, *44*, 101725. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101725>

Ponce, E. (2014). *Nostoc: un alimento diferente y su presencia en la precordillera de Arica* (Vol. 32). arica-Chile.

Prates, D. da F., Radmann, E. M., Duarte, J. H., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2018). *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell

growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, 256, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>

Rebolledo, J. (2019). Modelación fenomenológica de fotobiorreactores concéntricos con iluminación interna para el cultivo de microorganismos fotosintetizadores. Pontificia universidad catolica de chile. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE.

Ritchie, hannah and R. M. (2020). CO<sub>2</sub> and Greenhouse Gas Emissions - Our World in Data. Retrieved April 22, 2021, from University of Oxford website: <https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions#citation>

Rueda, E., García-Galán, M. J., Díez-Montero, R., Vila, J., Grifoll, M., & García, J. (2019). Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. *Bioresource Technology*, 122233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122233>

Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, Vol. 32, pp. 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>

Sharma, L., & Mallick, N. (2005). Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: Regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon

sources. *Bioresource Technology*, 96(11), 1304–1310.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009>

Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2017). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 29, pp. 1213–1232. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1006-1>

Singh, S. (2019). Cyanobacteria and their role under elevated co2 conditions. In *Climate Change and Agricultural Ecosystems: Current Challenges and Adaptation* (pp. 249–263). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483-9.00010-4>

Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, Vol. 762, p. 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>

Troschl, C., Meixner, K., & Drogg, B. (2017). Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years’ Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering*, 4(4), 26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>

Troschl, C., Meixner, K., Fritz, I., Leitner, K., Romero, A. P., Kovalcik, A., ... Drogg, B. (2018). Pilot-scale production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate with the

cyanobacterium *Synechocytis sp.* CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Research*, 34, 116–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.011>

Vieira de Mendonça, H., Assemany, P., Abreu, M., Couto, E., Maciel, A. M., Duarte, R. L., ... Reis, A. (2021). Microalgae in a global world: New solutions for old problems? *Renewable Energy*, 165, 842–862.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.11.014>

Yashavanth, P. R., Das, M., & Maiti, S. K. (2021). Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105379.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105379>

Zhang, C., Show, P. L., & Ho, S. H. (2019). Progress and perspective on algal plastics – A critical review. *Bioresource Technology*, 289(June), 121700.

**ANEXOS**

## **ANEXO A: DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PHB POR HIDROLISIS ÁCIDA**

### A-1. Materiales y equipos:

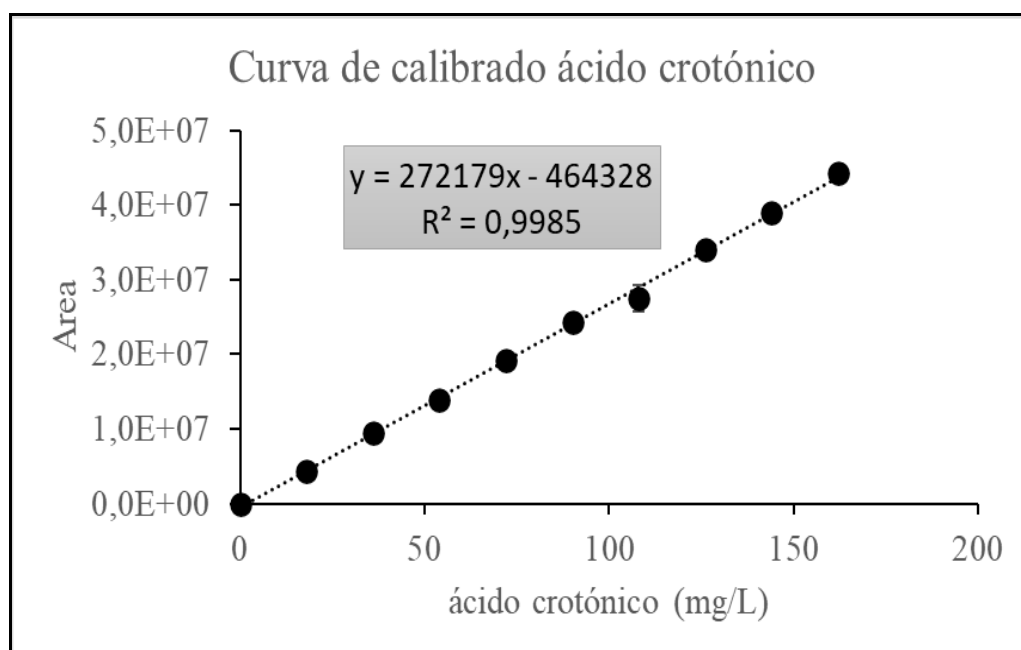
- Ácido crotónico, Ácido sulfúrico, tubos ependorf de 1,5 ml, balanza analítica, Shaker orbital, filtros de jeringa de PDVF con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , HPLC acoplado a un detector UV.

### A-2. Procedimiento:

- Para esto se pesaron entre 2,5 y 3,5 mg de biomasa seca en los tubos ependorf y se le adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (marca Winkler).
- La mezcla se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h, en un Thermo-Shaker marca biosan modelo TS-100.
- Las muestras se dejan enfriar y se diluyen diez veces con agua Mili Q.
- Se filtran las muestras utilizando los filtros de jeringa.
- Se analizan las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer. Se utiliza una longitud de onda de 215 nm, con ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , a una temperatura de trabajo de 35 °C y un flujo de 0,6  $L \text{ min}^{-1}$ .
- Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibrado de ácido crotónico.

## ANEXO B: CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO CROTÓNICO

- En primer lugar, se preparó una muestra estándar de ácido crónico de concentración de 218 mg/L, la cual se diluyó en concentraciones de 2, 20, 40, 60, 80, 110, 130, 150 y 170 mg/L, para elaborar la curva de calibrado.
- Las diluciones de realizaron con agua mili Q. Cada muestra debe ser filtrada con un filtro de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectada al sistema de medición.
- Se analizan las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer. Se utiliza una longitud de onda de 215 nm, con ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , a una temperatura de trabajo de 35  $^{\circ}\text{C}$  y un flujo de 0,6  $\text{L min}^{-1}$



## ANEXO C: PREPARACIÓN DEL MEDIO ES MODIFICADO

### C-1: Preparación del medio basal

	Medio Basal ES 1L
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1,2 g/L
<b>K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,02 g/L
<b>MGSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,02 g/L
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,036 g/L
<b>BICARBONATO</b>	1 g/L
<b>SOLUCION MICRONUTRIENTES</b>	5 mL
<b>AGUA DESIONIZADA</b>	995 mL

Autoclavar el medio basal a 121 °C por 15 min a 15 lb de presión. La solución de micronutrientes se agrega a la solución basal autoclavada filtrando con filtro de jeringa de 0,22 µm marca Sartorius. El medio ES modificado se puede preservar mediante refrigeración.

### C-2: Preparación de la solución de micronutrientes

	Solución Stock (g/100mL)	Para preparar 1L
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.1	1 mL
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	0.1	2 mL
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0.2	5 mL
<b>Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.02	5 mL
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.02	5 mL
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.0005	1 mL
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>		0.7 g
<b>EDTA</b>		0.8 g

La solución de micronutrientes se autoclava separadamente en dos soluciones:

Solución I: 881 ml agua +solución stock de sales sin hierro+0,4 gEDTA

Solución II: 100 ml agua desionizada + 0,7 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O + 0,4 g EDTA

**ANEXO D: ANALISIS ESTADÍSTICO DE DIFERENCIAS DE MEDIAS  
DE DUNCAN MEDIANTE SPSS**

**D-1: Grupos homogéneos de Duncan para la producción de biomasa después  
de 4 días de incubación**

<b>Biomasa a los 4 días</b>				
<b>Grupos homogéneos de Duncan<sup>a</sup></b>				
<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>		
		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
<b>ES Control</b>	2	0,15125		
<b>ES Rojo</b>	2		0,08625	
<b>ES Azul</b>	2		0,0525	0,0525
<b>ES Verde</b>	2			0,00875
<b>Sig.</b>		1,000	,184	,106
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.				

**D-2: Grupos homogéneos de Duncan para la producción de biomasa después  
de 12 días de incubación**

<b>Biomasa a los 12 días</b>			
<b>Grupos homogéneos de Duncan<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>	
		<b>a</b>	<b>b</b>
<b>ES Control</b>	2	0,2479	
<b>ES Rojo</b>	2	0,2207	
<b>ES Azul</b>	2		0,0643
<b>ES Verde</b>	2		0,0843
<b>Sig.</b>		0,493	0,6090
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.			

**D-3: Grupos homogéneos de Duncan para el efecto de la deficiencia de N, P y C y longitudes de onda de luz sobre la producción de biomasa**

<b>biomasa</b>			
Duncan <sup>a</sup>			
<b>Tratamientos</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>	
		<b>a</b>	<b>b</b>
<b>ES Control</b>	3	0,259	
<b>ES<sup>+</sup>N P</b>	3	0,238	
<b>ES<sup>+</sup>N P C</b>	3		0,087667
<b>ES<sup>+</sup>N P Azul</b>	3		0,101000
<b>ES<sup>+</sup>N P Rojo</b>	3		0,138000
Sig.		0,371	0,057
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.			