

LICENCIATURA EN BIODIVERSIDAD

TESINA

“Aislamiento y caracterización de microorganismos fotosintéticos acuáticos con potencial uso biotecnológico”

Estudiante: **AGUSTIN EDUARDO TACCA**

Directora: **Melina Devercelli**

Codirectora: **Paula Huber**

Lugar de trabajo: **INALI CONICET-UNL y GiiB-FBCB UNL**

Santa Fe, agosto 2023



**UNL • FACULTAD
DE HUMANIDADES
Y CIENCIAS**

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
METODOLOGÍA.....	8
Establecimiento de condiciones de cultivo.....	8
Desarrollo de cultivos en fotobiorreactores (FBR).....	10
Caracterización morfológica y genética de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	12
Caracterización fisiológica de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	13
Producción de pigmentos fotosintéticos en la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	16
RESULTADOS.....	20
Desarrollo de la colección de microorganismos fotosintéticos.....	20
Cultivos de Cyanobacteria en BG-11.....	22
Cultivos de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.en BBM.....	23
Caracterización morfológica de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	26
Caracterización genética de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	29
Propiedades ópticas de la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp.....	34
Evaluación de la producción de biomasa y pigmentos en la cepa aislada <i>Tetradasmus</i> sp. en relación a la concentración de nitrato e intensidad de luz.....	38
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIÓN.....	62
ANEXOS.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	86

AGRADECIMIENTOS

**A los que me acompañaron desde el principio,
y a los que se han ido sumando en el camino**

A mis directores de cientibeca, Manuel y Rodrigo, que ayudaron a gestar y promover lo que hoy, gracias a mis directoras Melina y Paula, es mi tesina de grado. Gracias por su constante acompañamiento y disponibilidad. A los grupos de trabajo del Laboratorio de Plancton (INALI-CONICET-UNL), Grupo de Innovación de Ingeniería en Bioprocesos (GiiB-FBCB) y Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM-FBCB), que amablemente siempre me recibieron. A los miembros del jurado, cuyas sugerencias y observaciones permitieron mejorar la calidad del trabajo. A la Universidad Nacional del Litoral, que me formó como Técnico y Licenciado, brindándome a la par grandes posibilidades y buena compañía.

RESUMEN

En los últimos años, ha habido un creciente interés en los cultivos de microorganismos debido al potencial uso médico y biotecnológico de los metabolitos y pigmentos que producen. Dicha producción depende de la cepa pero también de varios factores en su cultivo, como la intensidad de la luz y la concentración de nutrientes. En este trabajo se diseñó una metodología para desarrollar una colección de microorganismos fotosintéticos de agua dulce con interés para la investigación científica y aplicaciones biotecnológicas, que incluye una especie nativa. Se aisló una cepa nativa del género *Tetrademus* proveniente de una laguna de la llanura aluvial del río Paraná y se la caracterizó morfológicamente a través de microscopía, molecularmente a partir de la secuenciación de un fragmento del gen 18S ARNr, y fisiológicamente en cuanto a la eficiencia en la absorción de luz mediante la cuantificación de las propiedades ópticas de los cultivos. Se evaluó también su crecimiento y producción de pigmentos bajo diferentes intensidades de luz y concentraciones de nitrato utilizando un diseño central compuesto (punto central $168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y 0.25 g/L N). Los resultados obtenidos sugieren que en cultivos con baja intensidad de luz y elevada concentración de nitrato se podría promover la producción de pigmentos, entre ellos luteína, un carotenoide xantófilo de elevado interés farmacéutico. Esta es una primera aproximación al estudio de una microalga nativa y a la puesta a punto de una colección de microorganismos cuya producción de metabolitos y potencial biotecnológico a escala de laboratorio o industrial podrá ser investigado en futuros trabajos.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas además de encontrarse en ambientes marinos, de agua dulce e incluso terrestres, presentan una gran diversidad a nivel bioquímico y morfofisiológico. Son organismos principalmente fotosintéticos que tienen un rol esencial en la producción de oxígeno, contribuyendo con hasta el 50% del oxígeno en la atmósfera (Prata et al., 2019). Además son un eslabón fundamental en las cadenas tróficas acuáticas, por lo que cualquier variación en sus poblaciones puede afectar la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Wu et al., 2019). Consecuentemente, el interés en su estudio y comprensión ha ido en aumento, por lo que se han desarrollado numerosos métodos para su aislamiento y cultivo. El cultivo de microorganismos fotosintéticos ha representado un avance en ciencia básica en numerosas áreas, como lo son la evolución, genómica, fisiología, diversidad y sistemática (Cadoret et al., 2012; George, et al., 2014; Xia et al., 2014; Emami et al., 2015; Rahmatpour, 2021). De aquí la importancia de mantener cepas vivas en colecciones que permitan el acceso a nuevos niveles

de conocimiento, sobre todo de organismos nativos y que manifiesten adaptaciones propias a cada tipo de ambiente. Por este motivo, el objetivo general de esta tesina fue diseñar una metodología para desarrollar una colección de microorganismos fotosintéticos de agua dulce con interés para la investigación científica y aplicaciones biotecnológicas, que incluya especies nativas.

Las líneas de investigación actuales tienden al descubrimiento y desarrollo de productos naturales a partir de microorganismos fotosintéticos aislados con potencial uso biotecnológico y medicinal (Andersen, 2005), por lo que es fundamental conocer las condiciones adecuadas para su cultivo y proliferación a mayores escalas. Como metabolitos de interés analizados en microalgas pueden destacarse los carotenoides, entre ellos pigmentos como la luteína y astaxantina, atractivos para la industria farmacéutica. Los carotenoides son biomoléculas lipofílicas, cuya función radica en la protección de los aparatos fotosintéticos. Además, constituyen una defensa frente al estrés oxidativo, que puede deberse al estrés ambiental o también a variaciones de luz significantes que afecten el aparato fotosintético (Christaki et al., 2013). Los carotenoides se pueden clasificar, desde un punto de vista estructural, como carotenos (hidrocarbonados) o xantofilas (oxigenados). Dentro de las xantofilas se encuentra la luteína, un pigmento derivado de la hidroxilación del α -caroteno, con un amplio espectro de usos en relación a los beneficios a nivel de la salud humana (Zheng et al., 2022). Entre las principales características, se destacan las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Hasta el momento, la principal fuente de luteína para la extracción comercial son los pétalos de caléndulas (Asteraceae). Sin embargo, numerosos trabajos (Del Campo et al., 2007; Sánchez et al., 2008; Ho et al., 2014) respaldan que la producción de luteína a partir de microalgas puede ser más eficiente, sobre todo si se trata del género *Scenedesmus* (Zheng et al., 2022), sinónimo en algunos casos de *Tetradesmus*. La producción de luteína empleando microalgas presenta ventajas como ser la mayor tasa de crecimiento, la versatilidad en cuanto a su cosecha, y los metabolitos extras que se pueden obtener (carbohidratos, lípidos, proteínas) (Ho et al., 2014), lo que justifica avanzar en estas líneas de investigación.

Se sabe que la acumulación de luteína en las microalgas depende en parte de la disponibilidad de nitrógeno. La concentración de nitrógeno en el medio en que se desarrollan las microalgas, bajo una determinada intensidad lumínica, es un factor fundamental ya que influye directamente en su metabolismo y consecuentemente en su crecimiento y acumulación de lípidos (Xin et al., 2010). Según Zheng et al. (2022) las condiciones de estrés por nitrógeno, ya sea por exceso o deficiencia, promueven la acumulación de luteína, mientras que en ausencia de dicho nutriente se desencadena la degradación del lípido. Además, dichos autores

sostienen que como los carotenoides son fundamentales en la protección de las microalgas frente al daño por estrés oxidativo en los aparatos fotosintéticos, la luz es una variable relevante de evaluar a diferentes niveles. Una elevada incidencia de luz desencadenaría la acumulación de luteína en las microalgas como respuesta al estrés. Incluso los autores muestran diferencias en la producción de luteína en dos cepas de *Scenedesmus* sp. bajo diferentes intensidades de luz. Esto fundamenta la influencia de la intensidad lumínica en la producción de luteína, que además es claramente especie-específica, por lo que es relevante evaluarla junto a la concentración de nitrato del medio.

Siguiendo con la significativa influencia de la luz, un método para hacer más eficiente el uso de la misma en unidades de cultivo como fotobiorreactores (FBR), es el análisis de las propiedades ópticas (PO) de los cultivos. Las PO pueden utilizarse como un parámetro para calcular de una manera relativamente sencilla, la cantidad de luz que es absorbida por una suspensión de microalgas. Los valores obtenidos de las mediciones de dichas propiedades, permiten entonces tomar decisiones para optimizar la cantidad y calidad de luz que se hace incidir en los cultivos (Lee et al., 2013). Esto no es una cuestión menor ya que posibilitaría una optimización en el escalado de los cultivos, desde etapas tempranas en Erlenmeyers o FBR pequeños hasta niveles industriales, con las potencialidades comerciales que ello implica. Las PO pueden variar debido al tamaño y forma de las células que interactúan con la luz, los índices de refracción de las estructuras celulares internas y externas, y el contenido general, la distribución, y la concentración local de moléculas que absorben la luz dentro de las células, lo que justifica realizar y comparar las determinaciones en las distintas etapas de los cultivos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los FBR son sistemas de cultivo discontinuo en los cuales las condiciones internas varían debido a consumo de nutrientes, cambios en la biomasa, en el pH entre otros, que son detectados también por las PO. Por lo tanto, si bien el estudio de PO en los FBR no permite determinar valores máximos y mínimos absolutos reales de absorción, sí es posible detectar niveles de absorción “máxima” o “más efectiva” y así determinar los momentos de mayor o menor absorción en vista de una optimización de la energía radiante; es por esto que el análisis de las PO suele ser uno de los principales estudios al momento de hallar óptimos de luz para un cultivo en FBR. Por ejemplo, recientemente Ibañez y colaboradores (Ibañez et al., 2022) emplearon esta metodología en el estudio de *Haematococcus pluvialis*, una eucariota volvocal con un complejo ciclo de vida dentro del cual, bajo determinadas condiciones de estrés, ocurre una etapa de aplanospora: una estructura de resistencia con elevada producción de astaxantina (Shah et al., 2016). En este trabajo, los autores detectaron la variación en las proporciones celulares a través de las PO registradas

como coeficientes específicos de absorción, lo que sienta las bases para que un operario ejecute decisiones respecto a las condiciones de iluminación del cultivo para evitar o promover la formación de aplanosporas por estrés lumínico. Éste constituye sólo un ejemplo sobre la posible aplicación de las PO orientada a la producción de un metabolito particular.

La variedad de metabolitos que se pueden evaluar está relacionada a la diversidad de organismos disponibles. Dentro del complejo sistema que forma el río Paraná se han reportado cerca de 800 taxones diferentes de fitoplancton, destacándose que la gran mayoría de la riqueza corresponde a las clorofitas y diatomeas (Devercelli et al., 2014). Dentro de las clorofitas, numerosas cepas de *Scenedesmus* sp. han sido aisladas y estudiadas tanto en relación a la ciencia básica como para su aplicación biotecnológica (Sánchez et al., 2007; Mandal & Mallick, 2009; Ilavarsi et al., 2011). Este género se caracteriza por ser abundante en sistemas de agua dulce, y presentarse tanto de manera solitaria como formando cenobios de 4, 8, 16 e incluso 32 células (Johnson et al., 2007). Son organismos que presentan plasticidad fenotípica, es decir que su morfología puede verse alterada de acuerdo a las condiciones ambientales (Lüring M., 2003), por lo que la identificación mediante características morfológicas es dificultosa, sobre todo cuando se trata de organismos extraídos directamente de muestras ambientales. Por otro lado, este género sufrió cambios recientes en su taxonomía y numerosas especies fueron transferidas a distintos géneros como *Desmodesmus* y *Tetradasmus* en base a estudios morfológicos y genéticos (Bicudo & Menezes, 2006; Wynne & Hallan, 2015). En consecuencia, es de gran importancia realizar una descripción a nivel morfológico acompañada por información molecular, ambos aspectos relevantes y complementarios. Esto, a su vez, permite también avanzar en líneas de optimización de las condiciones de cultivo de los organismos, y con ello el rendimiento en la producción de metabolitos con potencial aplicación biotecnológica.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar una metodología para desarrollar una colección de microorganismos fotosintéticos de agua dulce con interés para la investigación científica y aplicaciones biotecnológicas, que incluya especies nativas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

OE 1. Establecer las condiciones de laboratorio adecuadas para el cultivo de distintas cepas de microorganismos fotosintéticos.

OE 2. Desarrollar cultivos a escala intermedia en fotobiorreactores (FBR).

OE 3. Realizar la caracterización morfológica y genética de una cepa de microalga nativa aislada.

OE 4. Analizar la eficiencia en la absorción de la luz de cultivos de la cepa nativa aislada a diferentes longitudes de onda, mediante la cuantificación de sus propiedades radiativas.

OE 5. Evaluar el rendimiento de la producción de biomasa y pigmentos fotosintéticos con potencial aplicación biotecnológica de la cepa de microalga nativa aislada.

METODOLOGÍA

Establecimiento de condiciones de cultivo

Para el establecimiento de las condiciones de cultivo se evaluó la adaptación y el crecimiento de tres especies de microalgas: *Tetradismus* sp. (Eucariota) aislada en este trabajo, *Synechococcus* sp. (Picocianobacteria) aislada por la Dra. Huber, y *Arthrospira maxima* (Cianobacteria filamentosa) adquirida comercialmente. La condición inicial de las cepas se describe a continuación.

-*Tetradismus* sp.: En el marco de un trabajo de Cientibeca, se realizó el aislamiento de una cepa de clorofita a partir de un cultivo no monoespecífico obtenido de una muestra ambiental de una laguna de la llanura aluvial del río Paraná (Fig. 6). Se utilizaron técnicas de diluciones seriadas en solución fisiológica (0.9 gr/L NaCl) y estriado en placa con agar bacteriológico 2% (Andersen, 2005) (Fig. 7 (A) y (B)). Una vez detectadas colonias en las placas, fueron recogidas con asa estéril y llevadas a tubos de ensayo con medio Bold's Basal Medium (BBM) (Sorokina et al., 2020) estéril para su proliferación (Fig. 7 (C)). Estos últimos cultivos fueron llevados a mayor volumen en Erlenmeyers de 100 mL y mantenidos para experimentar y analizar a mayores escalas (Fig. 7 (D)).

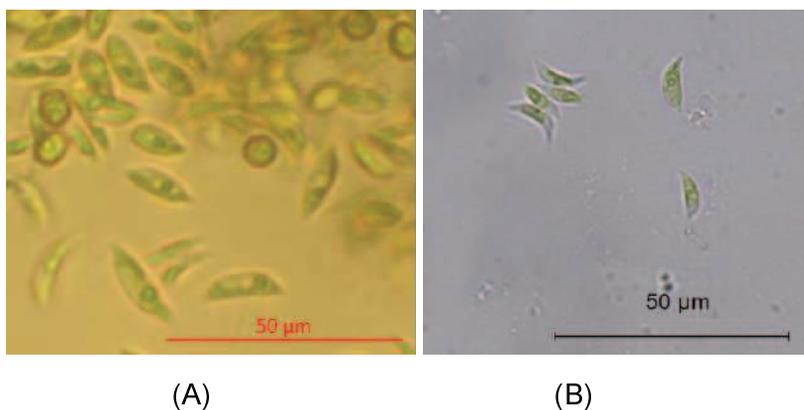


Figura 6 - (A) Cultivo no monoespecífico, donde fueron observadas células del tipo *Chlorella* sp., rotíferos, flagelados y cianobacterias. (B) Cultivo de *Tetradismus* sp. aislado.

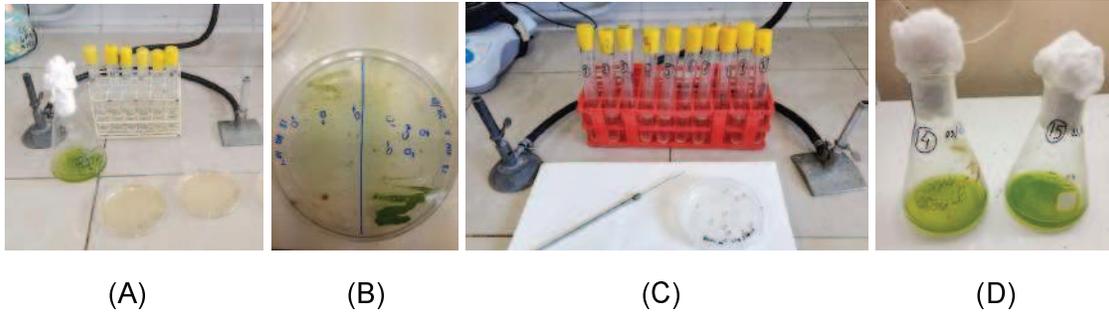


Figura 7 - Secuencia del proceso de aislamiento de *Tetradesmus* sp. (A) Erlenmeyer con cultivo de origen, tubos con solución fisiológica estéril y placas con agar 2%. (B) Placa con desarrollo de colonias de microorganismos fotosintéticos. (C) Traslado de colonias a tubos de ensayo con BBM estéril. (D) Erlenmeyers de 100 mL con *Tetradesmus* sp. aislado.

-*Synechococcus* sp.: Se escalaron cultivos existentes en INALI de 4 cepas de *Synechococcus* sp. aisladas por la Dra. Huber de la laguna de Chascomús. Se inocularon 2 mL en 4.5 mL de medio BG-11 estéril con vitaminas (1000 μ L/1000 mL) y se mantuvieron con fotoperiodo natural. Luego, la cepa CH-040 se llevó a Erlenmeyer de 250 mL para posteriores experiencias.

-*Arthrospira maxima*: Se partió desde un inóculo comercial. Se produjeron 5 tubos de ensayo con 1 mL de inóculo en 4 mL BG-11. Se dejaron en cámara en condiciones de luz del 70%. Los tubos que presentaron buen crecimiento se escalaron a Erlenmeyers de 250 mL en BG-11.

Para el desarrollo de este objetivo, se emplearon dos medios de cultivo: Bold's Basal Medium BBM (Sorokina et al., 2020) y BG-11 (Stanier et. al., 1971) utilizados frecuentemente en ceparios de microalgas (ver Anexo 1). Se ha visto que el medio BBM es más propicio para el desarrollo de chlorococcales y volvocales, mientras que BG-11 es más utilizado para el cultivo de cianobacterias (Andersen apx A). Sin embargo, algunos autores emplearon BG-11 para cultivar cepas de *Scenedesmus* sp. y *Tetradesmus* sp. (Xin et.al., 2010, Chen et. al. 2020). Dada esta controversia, se evaluó el crecimiento de las tres cepas en ambos medios de cultivo de forma cualitativa. Los medios a evaluar se prepararon y autoclavaron en Erlenmeyers de 250 mL, se realizaron los inóculos de las cepas respectivas y se observó su desarrollo durante 7 días.

Las condiciones de la cámara de cultivo (Demetra470L - J3Desarrollos) se mantuvieron a 25°C de temperatura y al 70% de intensidad de luz (168 μ mol/m²s). Este porcentaje de intensidad fue elegido para asegurar el crecimiento sin fotohinibición por escasez o exceso de luz (umbral que se supera generalmente en el orden de los 200 μ mol/m²s). Además, estos

valores de temperatura y luz se pueden considerar adecuados para el cultivo de los organismos fotosintéticos (Andersen 2005; Ho et al. 2012; Silva et al. 2014; DiCaprio et al., 2018; Jung et al., 2021).

Adicionalmente, se propagaron cepas de microorganismos fotosintéticos disponibles en GiiB-FBCB para, junto a las 3 especies que se evaluaron en este objetivo, establecer una colección en las instalaciones de INALI (CONICET-UNL).

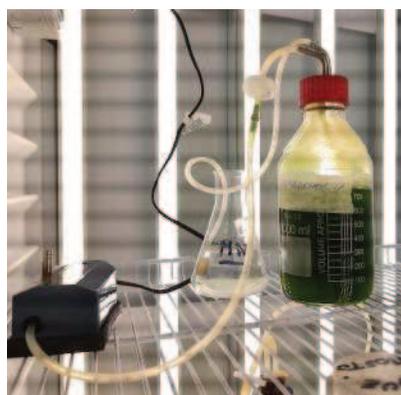
Desarrollo de cultivos en fotobiorreactores (FBR)

El desarrollo de cultivos en FBR se evaluó en las dos especies de cianobacterias (*A. maxima* y *Synechococcus* sp.) en BG-11, y de *Tetradismus* sp. en BBM. Los medios de cultivo para cada especie se escogieron según lo observado en los resultados de OE1.

Los FBR que se utilizaron fueron construidos con frascos tipo Schott de 1L con la tapa adaptada con mangueras para la salida e ingreso de aire filtrado (filtro 0.2 μm) (Fig.1 (B)). El aire fue suministrado por bombas de pecera y las mangueras de salida se colocaron en recipientes con agua para evitar ingreso de contaminantes.



(A)



(B)

Figura 1 - (A) Fotobiorreactor industrial (DASGIP® series) y (B) FBR casero para el cultivo de microorganismos fotosintéticos.

El crecimiento efectivo de las cepas en los FBR se evaluó en función a la producción de biomasa y en la absorción de luz (propiedades ópticas). Para ello, se prepararon y se autoclavaron los medios correspondientes en FBR de 1 L. Luego se inocularon las cepas respectivas para obtener un punto inicial de 0.1 de Densidad Óptica o Absorbancia a 750 nm (Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis). Los FBR fueron sometidos a 168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz en cámara de cultivo (Demetra470L - J3Desarrollos), y aireación con bombas de pecera.

Una vez iniciado el cultivo, se tomaron muestras de 25 mL en condiciones de esterilidad cada 24-48 hs durante 15-17 días, previa agitación del FBR para resuspender posibles sedimentos de las microalgas. Además, se controló que el volumen se mantuviera relativamente constante y que no sufriera pérdidas significativas por evapotranspiración.

Para la determinación de la biomasa, se empleó un método gravimétrico, por diferencia de pesadas (López Arias et. al., 2016). Para ello: 1) se secaron y pesaron tubos Eppendorf (Peso Inicial: PI); 2) se vertió un volumen conocido de muestra en los tubos previamente pesados. 3) Los tubos se centrifugaron a 150 RPM ("Dragon Lab" D2012 Micro Mini) durante 3 minutos para decantar los organismos, y se descartó el sobrenadante (Fig. 2). 4) Los tubos se llevaron a estufa durante 24 hs y una vez enfriados en desecador fueron pesados hasta peso constante (Peso Final: PF). La diferencia entre el peso de los tubos PF y los tubos PI da como resultado la biomasa total, que fue referida al volumen de donde fue obtenida. Para las etapas tempranas de los cultivos, debido a que la biomasa era muy baja y en consecuencia el error demasiado grande, se concentró la biomasa de 10 mL. Para ello se cargaron los Eppendorf pesados con 1 o 2 mL de cultivo, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se volvió a cargar hasta llegar a los 10 mL finales. La biomasa resultante luego fue referida a esos 10 mL. Este procedimiento se realizó por duplicado para disminuir errores metodológicos.



Figura 2 - Concentración y centrifugación del cultivo para la determinación de biomasa.

La determinación de la eficiencia en la absorción de luz se realizó en función a las (PO), obtenidas a partir del registro por triplicado de la absorbancia de los cultivos en el espectro visible (400-750 nm) en espectrofotómetro (Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis). La fundamentación de la técnica se desarrollará más adelante. Se tomó ventaja de esta determinación para obtener también la Absorbancia o Densidad Óptica (DO) a 750 nm, con la que para el caso de *Tetradismus* sp. se realizó una curva de calibrado de la DO en función de la biomasa.

Además del cálculo de biomasa y estudio de (PO), se realizó un seguimiento visual permanente en microscopio (Boeco BM-117) para verificar la composición monoespecífica del cultivo y el estado de las células. Adicionalmente, en el caso de *Tetradasmus* sp. se registraron las proporciones de los morfotipos celulares y el número total de células en cámara de Neubauer. Se registraron tres morfotipos: Células Individuales (CI), Cenobios de 2 Células (C2) y Cenobios de 4 Células (C4).

Caracterización morfológica y genética de la cepa aislada *Tetradasmus* sp.

La caracterización morfológica de la cepa aislada *Tetradasmus* sp. se realizó mediante microscopía óptica (400 aumentos) y uso de claves específicas y publicaciones recientes (Smith, 1913; Komárek & Fott, 1983; Wynne & Hallan, 2015). Se realizaron registros fotográficos y mediciones del ancho y longitud de células individuales y cenobios con el programa Zen 3.6 (Lite) de los estados normales (44 células totales) y bajo estrés fisiológico por agotamiento de nutrientes de las células de la cepa aislada (29 células totales). Para el análisis de datos se utilizaron los programas Excel, Past 4.03 y R-Studio. Se realizaron comparaciones con test t de las medias de las mediciones tomadas.

Para la caracterización genética se concentró 1 ml de cultivo mediante centrifugación (10000 rpm, por tres minutos) y se extrajo el ADN mediante el método de CTAB (Fernandez Zenoff et al., 2006) descrito en Huber (2017). Del ADN extraído se utilizó 1 μ L como molde para la amplificación del gen 18S ARNr mediante la técnica de PCR (Desnaturalización Inicial: 94°C (4 min); Desnaturalización: 94°C (1 min); Anidamiento: 55°C (1 min); Extensión: 72°C (2 min); Extensión Final: 72°C (10 min); 30 ciclos - ver mix de PCR en Anexo 3). Para ello se emplearon los primers universales para eucariotas: 18S F (Kranz et al., 1995) y 18S 1200 R (Huss et al., 1999), obteniéndose fragmentos de aproximadamente 1200 pb. Para evaluar la amplificación exitosa, los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1,2 % por medio de electroforesis. Se sembraron 5 μ L de muestra con 2 μ L de buffer de siembra azul de bromofenol. Para la tinción se utilizó el colorante gel red.

El producto de PCR proveniente del ADN extraído de la cepa aislada fue secuenciado con el primer 18S F, mediante el método de Sanger utilizando un servicio externo (Macrogen, Inc) y los resultados se compararon en la plataforma BLAST (Altschul et al., 1990) con la base de datos de secuencias genéticas, GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Posteriormente se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud para determinar la posición taxonómica de la cepa aislada. Para ello se descargaron desde GenBank secuencias del gen 18S ARNr (largo mínimo 700 pb) de

diferentes grupos de microalgas (ver Anexo 3), y se alinearon junto a la secuencia de la cepa aislada. El alineamiento se realizó con el programa Mafft (Kato et al. 2002) y la construcción del árbol con el programa RAxML (Stamatakis, 2014), utilizando el modelo evolutivo GTRGAMMA, previamente seleccionado utilizando el programa modeltest-ng v0.1.5 (<https://github.com/ddarriba/modeltest>), y 1000 repeticiones. La visualización y edición del árbol se realizó con los programas Geneious (versión Prime 2023.1, <https://www.geneious.com>) y itol tree (<https://itol.embl.de>).

Caracterización fisiológica de la cepa aislada *Tetradismus* sp.

Para la caracterización fisiológica fueron empleadas las PO, ya que se pueden pensar como valores que reúnen toda la información fisiológica y fisicoquímica para un momento particular a lo largo de la progresión de un cultivo de microorganismos fotosintéticos. Los valores obtenidos de las mediciones de dichas propiedades permitirían, en posteriores etapas, tomar decisiones para optimizar la cantidad y calidad de luz que se hace incidir en los cultivos, ya que no toda la energía luminosa que se absorbe es luego utilizada como energía química: parte se disipa por fenómenos térmicos y parte por fluorescencia.

Descripción del equipo

En líneas generales, el equipo contiene una fuente de luz monocromática (Láser Helmet - 520 nm) conectada a una fibra óptica inmóvil de 200 μm de diámetro (Thunder Optics, Francia). El haz de luz transmitido por dicha fibra óptica se hace incidir en una cubeta (6 mL) que puede ser sometida a agitación leve según el interés del operador. La luz que logre atravesar la cubeta es recogida por una segunda fibra óptica de 200 μm de diámetro (Thunder Optics, Francia) conectada a un brazo mecánico (motor Nema 17), que permite registrar los datos a diferentes ángulos alrededor de la cubeta con la muestra. El brazo mecánico responde a los comandos indicados desde un sistema de Arduino, y puede moverse sólo respecto a un eje vertical. La luz recolectada por la fibra óptica móvil es derivada a un espectrómetro (SMA-E spectrometer, Thunder Optics, France) que transduce la señal a intensidades de luz relativas y longitudes de onda, lo que es interpretado por un programa de computadora (Spectragryph, software libre) (Figuras 3 y 4).



Figura 3 - Esquema del equipo montado para la determinación de las propiedades ópticas de una suspensión.

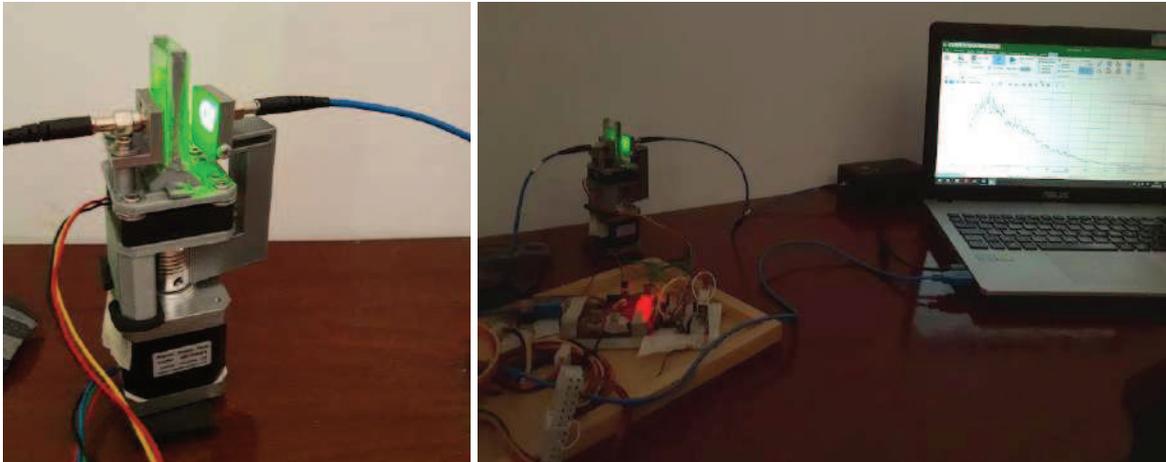


Figura 4 - Fotos del equipo para la determinación de las propiedades ópticas de una suspensión, montado en las dependencias de FBCB (UNL).

Explicación general del procedimiento

Para realizar el cálculo de las (PO), primeramente se debe realizar una calibración del sistema de iluminación, y luego se procede en dos etapas.

1- Calibración. Para calibrar por única vez (se debe recalibrar de manera periódica), se realiza una primera experiencia sin cubeta, en donde se lleva a cabo un barrido angular cada 1.8° (desde 0 a 180°) de la intensidad proveniente de la fuente de iluminación. Con esta información, se puede construir una función de distribución direccional y otra función de distribución espectral de la lámpara, lo que caracteriza en su totalidad al sistema, ya que permite conocer: 1) El Flujo Total de Fotones provenientes de la lámpara (PPF), 2) Cómo se distribuye espacialmente la energía emitida por la fuente de luz y 3) Cómo se distribuye la composición espectral de dicho dispositivo en las direcciones generadas en el haz de luz que impacta sobre la muestra. Luego, con fines de validación y por única vez, se realiza el mismo procedimiento en presencia de la cubeta vacía (cubeta sólo con aire dentro) y de la cubeta llena con agua destilada/desionizada/medio de cultivo. (Fig. 4.1.A, Anexo 4)

2- Etapa 1. Luego de calibrar, la primera etapa consiste en obtener un espectro “blanco”, que se realiza sin la cubeta, y permite referir la medición de cada día a la calibración realizada previamente.

3- Etapa 2. Por último, un segundo set de datos se obtiene midiendo la luz absorbida por una muestra del cultivo en una determinada cantidad de ángulos (una medición central y 14 en cada sentido, 29 mediciones en total). Luego, un programa realiza simulaciones a partir de esos datos para cubrir todos los ángulos, con lo que se obtiene un espectro “resultante” (Ibañez et al., 2020) (Fig. 4.2.A, Anexo 4).

El resultado del ajuste no lineal a través del método de Monte Carlo entre el espectro “resultante” y el espectro “blanco”, son las PO en el rango visible (400-700 nm), las cuales se obtienen en un set de 31 valores de coeficientes espectrales de absorción y de dispersión, y en un set de coeficientes adimensionales correspondientes a la función de fase de dispersión. Estas funciones de fase se calculan por defecto, y no tienen una utilidad directa para plantear una estrategia de control por luz en relación a las PO, aunque podrían emplearse en etapas posteriores para analizar el comportamiento de esta especie a escalas industriales. Por este motivo, en esta tesina como primera instancia sólo se evaluaron los coeficientes espectrales de absorción y dispersión.

Adaptación y simplificación de la metodología

En la actualidad no existe un único procedimiento considerado como un estándar para el cálculo de las PO, por lo que la comunidad científica acepta la utilización de uno, o de una combinación de ellos, entendiendo que la similitud de los resultados proviene de la correcta ejecución de los procedimientos, así como de las bases teóricas sobre las que se funda cada método para analizar la transferencia de energía radiativa (Luzi et al., 2022). Para este trabajo se utilizó el método de Monte Carlo (ó ray tracing), considerado de referencia en el ámbito de la Ingeniería de Bioprocesos para el cálculo de las PO y simulación del Campo de Energía Radiante. Se propuso la realización del cálculo de PO estándar (Heinrich et al., 2012a), que luego permitan inferir las PO de futuros cultivos a través del empleo de un espectrofotómetro de laboratorio registrando la absorbancia en el rango visible (400-700 nm). En otras palabras, una vez calibrada la metodología (descrita en el párrafo anterior), las PO de los cultivos pueden ser reconstruidas en el tiempo a través de medidas de absorbancia, más fáciles de ser obtenidas por los usuarios.

Se analizaron los espectros de absorbancia de cultivos de *Tetradismus* sp. en medio BBM desarrollados en los FBR. Se escogieron 3 réplicas en las que coincidieron exactamente

los días de muestra, para evitar realizar interpolaciones en las otras 2 experiencias (que sin embargo mostraron el mismo patrón). En estas 3 réplicas fue donde también se evaluaron los morfotipos y cantidad de células para *Tetradismus* sp. Para analizar los resultados se empleó el promedio de los datos obtenidos de PO para cada día. Se graficaron los coeficientes intrínsecos y específicos de absorción y de dispersión. Los coeficientes específicos se obtuvieron multiplicando a los coeficientes intrínsecos por la biomasa correspondiente al día evaluado. A cada gráfico resultante se le añadió un espectro de absorción de referencia de los pigmentos fotosintéticos, donde se indicó la zona en que cada pigmento suele presentar sus picos máximos. Para la determinación de estas regiones se siguió a Pilon et al. (2011), N'Soukpo-Kossi & Leblanc (1988) y Landrum & Bone (2001). Se indicaron la región de absorción de clorofila *a* (430-435 nm), clorofila *b* (entre 475-480 nm), clorofilas *a* y *b* (sus picos se solapan en el orden entre los 650 y 675-680 nm aproximadamente). En el caso de los carotenoides, la mayoría de los picos de los diversos metabolitos de esta naturaleza (astaxantina, zeaxantina, violaxantina, luteína, entre otros) coinciden en el rango aproximado entre los 420 y 510 nm. La luteína particularmente dentro de este rango presenta sus picos en 428, 445 y 474 aproximadamente.

Producción de pigmentos fotosintéticos en la cepa aislada *Tetradismus* sp.

Para el diseño experimental se empleó el software "Design Expert" (Alben, 2002), un programa que además de generar estrategias metodológicas para llevar adelante los ensayos (por ejemplo, la cantidad mínima de experiencias para cumplir criterios estadísticos y la combinación de factores en dichas experiencias), permite analizar los datos obtenidos mediante expresiones matemáticas. El ensayo se realizó siguiendo un Diseño Central Compuesto (DCC), que se emplea para obtener un modelo y encontrar las combinaciones óptimas de los factores (en este caso intensidad de luz y concentración de nitrato) en presencia de dos interacciones y el supuesto de no linealidad (Napolitano, 2010). En los DCC el mayor peso estadístico recae en el punto central (en este caso empleado como condición control), que fue realizado por quintuplicado tomando ventaja de los cultivos de *Tetradismus* sp. en FBR previamente realizados para cumplir objetivos anteriores. En la tabla 1 se muestran las experiencias propuestas por el programa, que otorgó las combinaciones de niveles de cada factor, a partir del rango de trabajo que se le indicó según la disponibilidad de material y experiencias realizadas. Las combinaciones de los factores sugeridas, cubren la totalidad del rango indicado. Los resultados de estas experiencias fueron cargados al programa como rendimiento de producción de biomasa, clorofilas totales y carotenoides totales, con los que se

obtuvo un modelo para el rendimiento de cada una de estas variables respuesta. Para evaluar la contribución de cada variable explicativa al modelo, se calculó el porcentaje de aporte o explicación de cada una de ellas (concentración de nitrato e intensidad de luz) y de su interacción, tomando como total la sumatoria de la suma de cuadrados de cada una de ellas (ver Anexo 5).

Tabla 1 - Diseño experimental sugerido por Design Expert. Se indica la concentración de nitrato e intensidad de luz para cada una de las experiencias (EXP) y de la EXP Control (5 réplicas).

EXP N°	Concentración de Nitrato (g/L)	Intensidad de Luz ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)
Control 1	0.250	168
2	0.381	80
3	0.250	44
Control 2	0.250	168
Control 3	0.250	168
Control 4	0.250	168
7	0.435	168
8	0.119	80
9	0.381	256
10	0.250	292
Control 5	0.250	168
12	0.119	256
13	0.065	168

Las experiencias se realizaron en etapas, debido a la disponibilidad de FBRs y las diferentes condiciones de luz requeridas en la cámara de cultivo. Como la cámara (Demetra470L - J3Desarrollos) posee la fuente de luz en la parte anterior, con una misma configuración en la intensidad de luz se pudieron realizar experiencias con diferentes intensidades variando la posición de los FBRs en la cámara. Para cada set de experiencias, se prepararon los medios de cultivo con la concentración correspondiente de nitrato en la forma de NaNO_3 , se autoclavaron en FBR de 1L y se inocularon con cultivos de reserva de *Tetradismus* sp. para obtener un punto inicial de DO a 750 nm de 0.1. Luego se colocó cada FBR en la posición correspondiente dentro de la cámara seteada a la intensidad de luz adecuada. Se destaca que la cámara se configuró para que el otorgamiento de luz sea constante, es decir sin fotoperíodo. Una vez iniciado un set de ensayos, durante 15 días y cada 24-48 hs se registraron las PO, biomasa por gravimetría, DO a 750 nm y se colectaron las muestras para

determinación de pigmentos fotosintéticos. Para ello, por duplicado se tomaron 750 μL de cultivo en tubo Eppendorf y se centrifugaron a máxima velocidad (150 RPM) durante 5 minutos en centrífuga ("Dragon Lab" D2012 Micro Mini). Se descartó el sobrenadante y el pellet se congeló en freezer con el fin de procesar todas las muestras con mayor disponibilidad de tiempo.

Para la extracción de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a*, *b*, y carotenoides totales) se utilizó una técnica destructiva con solvente (Hosikian et al., 2010) (Figura 5). A cada pellet descongelado se le agregó 1 mL de alcohol etílico absoluto como solvente extractor y se añadieron pequeñas esferas de vidrio cuya función fue la destrucción mecánica de las paredes celulares y estructuras como plastos que pudieran contener los pigmentos a determinar. El tubo fue sometido a agitación en un shaker (Velp Scientifica Classic Advanced) durante 15 minutos. Luego se centrifugó nuevamente (150 RPM, 5') para decantar todos los residuos celulares que pudieran interferir en la determinación. Seguidamente se realizó una dilución 1/3, para lo que se colocaron 400 μL del sobrenadante (alcohol etílico absoluto + pigmentos) en 800 μL de alcohol etílico absoluto en otro tubo Eppendorf. Una vez finalizada la extracción y dilución de los pigmentos, se procedió a la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis) en las longitudes de onda correspondientes: 470, 649 y 665 nm. El alcohol etílico absoluto fue fijado como blanco y se empleó la misma cubeta para cada determinación con el objetivo de disminuir el error. Los datos obtenidos fueron trasladados a concentración de pigmentos según las fórmulas provistas por Ritchie (2006).

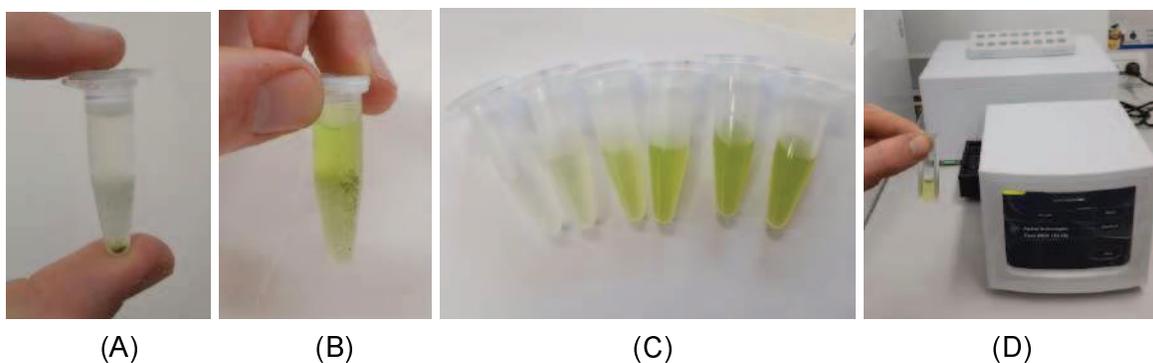


Figura 5 - Secuencia de la técnica para extracción de pigmentos. (A) Pellet producto de la centrifugación de 750 μL de cultivo de *Tetradismus* sp, al que se añadieron esferas de vidrio y solvente extractor. (B) Pigmentos extraídos con residuos centrifugados. (C) Concentración de pigmentos creciente en muestras consecutivas de un cultivo. (D) Pigmentos a determinar en espectrofotómetro.

Se evaluaron las cantidades totales de biomasa y concentración de pigmentos obtenidas al día final para cada experiencia, así como el rendimiento en la producción de estas variables. Para el cálculo de rendimientos, se tomó la máxima producción de biomasa (que coincidió en todos los casos con el día final de cultivo), se le restó la biomasa inicial, y se la dividió por la cantidad de días. El cálculo de rendimiento para carotenoides y clorofilas totales se hizo de la misma manera, pero para que estos valores sean comparables con los de biomasa se decidió tomar el valor de la concentración al día 15, restarlo por la concentración inicial y dividirlo por los 15 días de cultivo. Estos datos de rendimiento fueron ingresados al software Design Expert para su análisis.

RESULTADOS

Desarrollo de la colección de microorganismos fotosintéticos

Se cultivaron las 3 cepas de microorganismos fotosintéticos (*Tetradasmus* sp., *Synechococcus* sp. y *A. maxima*) en los medios BBM y BG-11. Se observó un mejor crecimiento de la especie aislada *Tetradasmus* sp. en BBM por sobre BG-11, tanto a nivel macroscópico determinado mediante el color del cultivo como microscópico, en cuanto a las morfologías celulares (Tabla 2). En el caso de las cianobacterias *A. maxima* y *Synechococcus* sp., presentaron buen crecimiento en BG-11, mientras que los cultivos en BBM, no prosperaron (Fig. 8).

Tabla 2 - Comparación del crecimiento de *Tetradasmus* sp., *Arthrospira maxima* y *Synechococcus* sp. en los medios de cultivo BBM y BG-11. La cantidad de signos (+) indica el desarrollo positivo de los microorganismos. Los signos (-) indican que no hubo crecimiento.

	BBM	BG-11
<i>Tetradasmus</i> sp.	+++	++
<i>Arthrospira maxima</i>	-	+++
<i>Synechococcus</i> sp.	-	+++



(A)

(B)

Figura 8 - Cultivos de *Synechococcus* sp., en medio BBM (A) en el que no prosperó y en BG-11 (B) donde el crecimiento fue bueno.

Se acondicionó un espacio del Instituto Nacional de Limnología para ser utilizado como sala de cultivo de microorganismos fotosintéticos (Fig. 9). Actualmente se mantienen un total de 10 cepas (4 picocianobacterias aisladas de la laguna de Chascomús por la Dra. Paula Huber en BG-11 nutrido con vitaminas 1000 μ l/1000mL, *Scenedesmus quadricauda* en BBM, *Chlorella vulgaris* en BBM, *A. maxima* en BG-11, *Tetradasmus* sp. aislada en este trabajo en BBM y 2 cepas de *H. pluvialis* en BG-11). Las cepas se mantienen en sus respectivos medios de cultivo en Erlenmeyers con fotoperíodo natural, y todos poseen sus réplicas en tubos de ensayo por duplicado.



Figura 9- Colección de microorganismos fotosintéticos mantenida en la sala de cultivos del Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET-UNL).

Desarrollo de cultivos a escala intermedia en fotobiorreactores

Cultivos de Cyanobacteria en BG-11

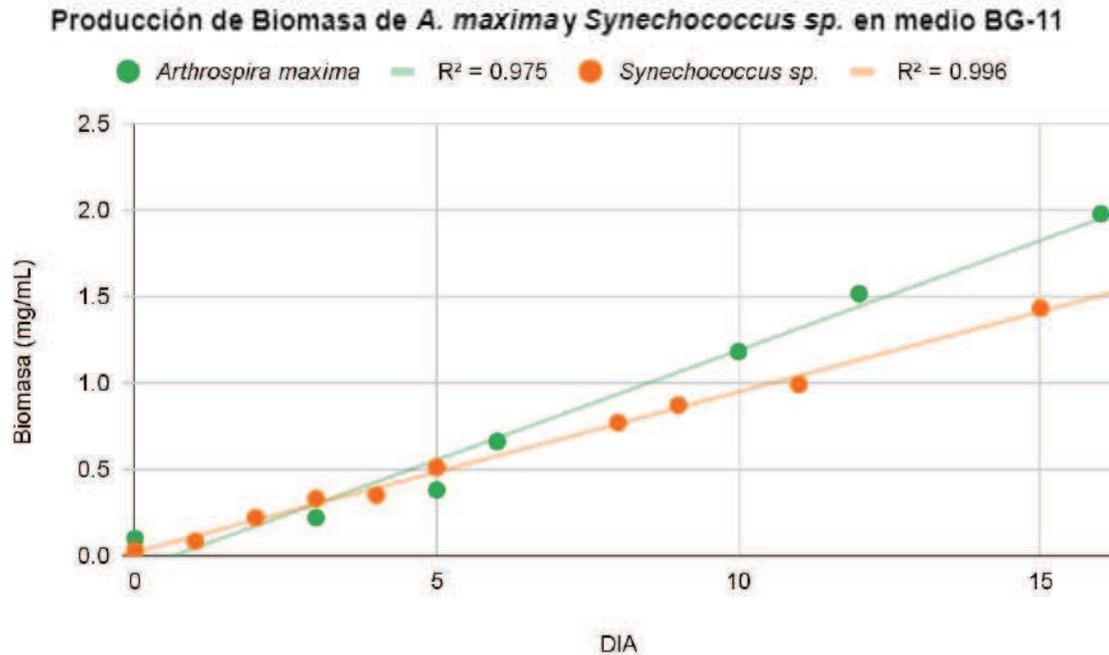


Figura 10 - Comparación de la producción de biomasa de las cianobacterias *Arthrospira maxima* y *Synechococcus sp.* en medio de cultivo BG-11.

Para la producción de biomasa de *A. maxima* y *Synechococcus sp.*, se partió de una Densidad Óptica DO 750 = 0.1 (determinada como se explicó previamente para *Tetradesmus sp.*) con una concentración de biomasa muy baja, de menos de 0.1 mg/mL. Ambas cepas se desarrollaron en medio BG-11.

Al día 16 la mayor cantidad de biomasa fue producida por *A. maxima* con 1.975 mg/mL por sobre los 1.43 mg/mL de *Synechococcus sp.* al día 15 (Fig. 10). Comparando los valores de R^2 , el ajuste a un modelo lineal de producción de biomasa fue mayor en *Synechococcus sp.* (0.996) que en *A. maxima* (0.975). El buen desarrollo de ambas especies fue observado en la determinación de PO (ver Anexo 2), donde se registraron valores crecientes de absorbancia de luz en los coeficientes específicos, indicadores en este caso del incremento de biomasa en los FBR.

Cultivos de la cepa aislada *Tetradasmus* sp.en BBM

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de biomasa en el tiempo de *Tetradasmus* sp. desarrollados en medio de cultivo BBM (Fig. 11). A partir de la curva obtenida, la producción de biomasa de la cepa aislada *Tetradasmus* sp. se comportó de manera acorde a un modelo logístico. Se observó una primera etapa de adaptación en las primeras horas de cultivo y luego una fase de crecimiento exponencial hasta el día 5 aproximadamente. Luego, entre los días 5 y 10 el crecimiento fue prácticamente lineal. Del día 10 en adelante, el cultivo ingresó en una fase más bien estacionaria, que se corresponde a la capacidad de carga del sistema bajo las condiciones dadas de cultivo ($168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 0.25 gr/L de nitrato, 25°C).

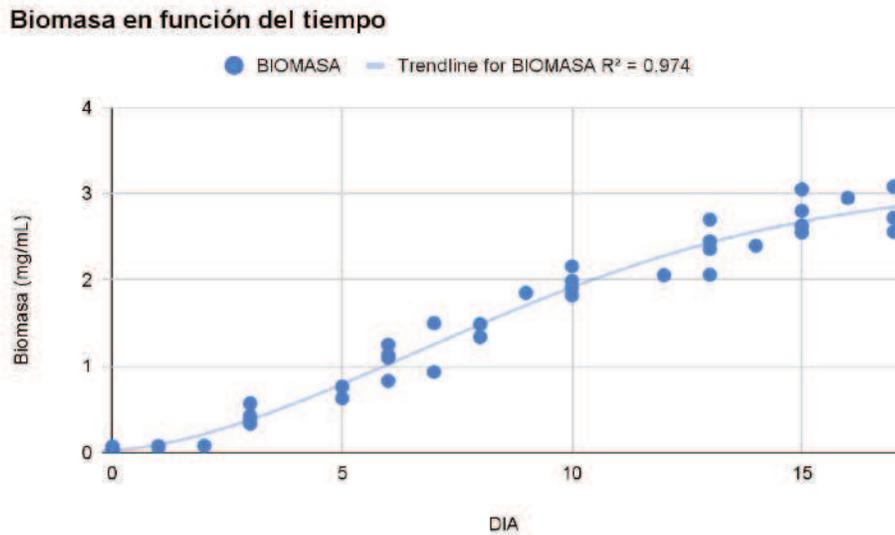


Figura 11 - Variación de la biomasa en el tiempo para *Tetradasmus* sp. (medio BBM, $168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz, 25°C , 5 réplicas).

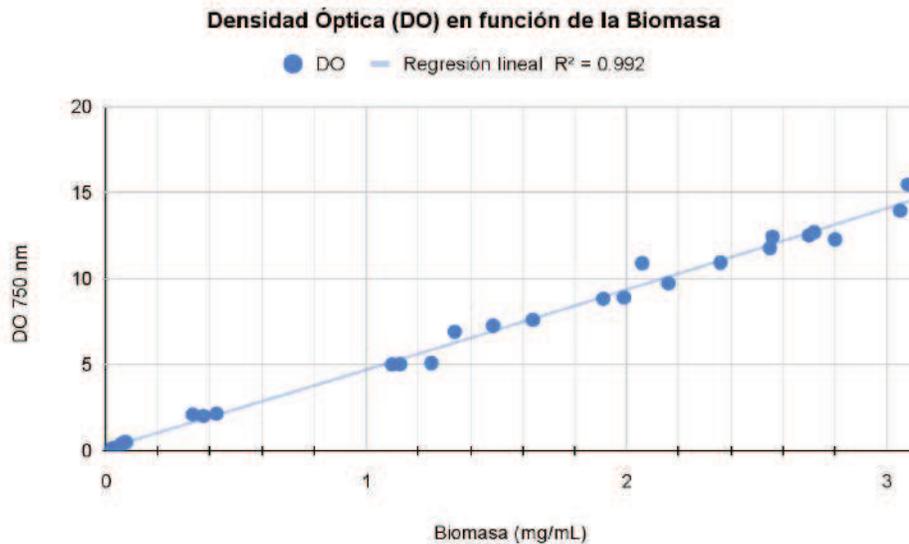


Figura 12 - Curva de la DO 750 en función de la biomasa de *Tetradismus* sp. (BBM, 168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz, 25°C, 3 réplicas). Correlación lineal significativa ($R^2= 0.992$).

La curva obtenida para el número promedio de células respecto al tiempo de cultivo (Fig. 13), mostró el mismo patrón que la curva sigmoidea a la que se ajustaron los datos de biomasa, aunque de manera menos pronunciada. Se observó una primera etapa de adaptación en las primeras horas de cultivo y luego una fase de crecimiento exponencial hacia el día 6, con un significativo desarrollo desde el día 3 al 6. En la etapa final del cultivo se observaron fluctuaciones en el número de células desde el día 8 en adelante, lo que se relaciona a la mayor variabilidad en la biomasa, y a la fase estacionaria del cultivo.

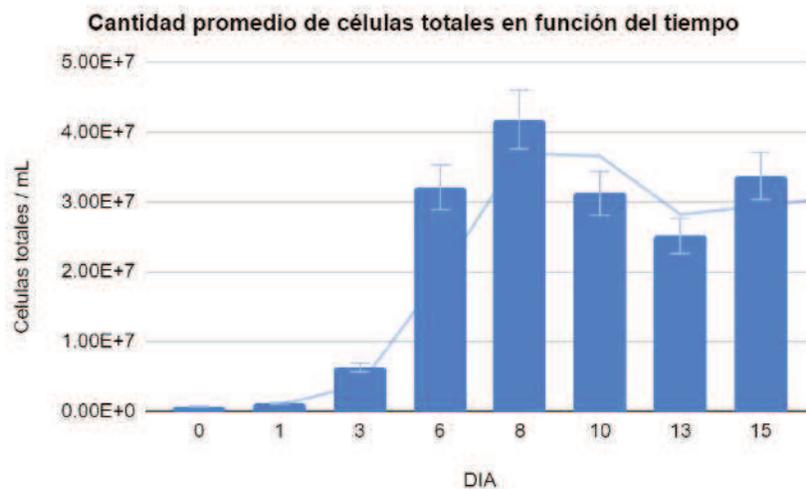
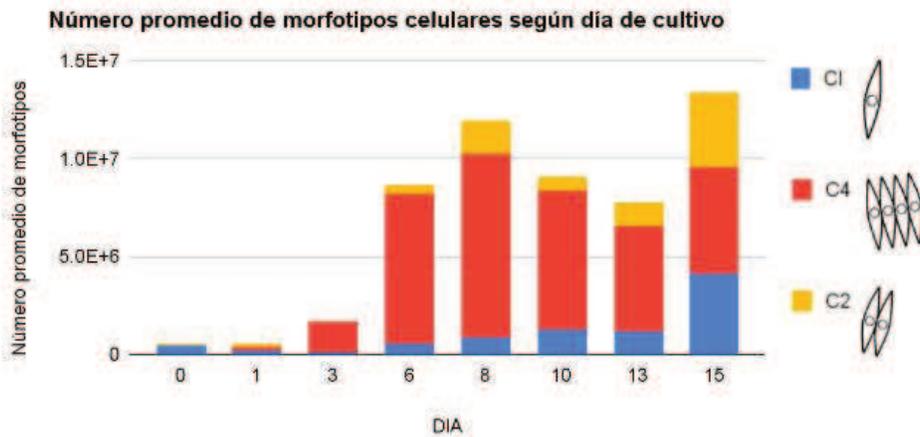
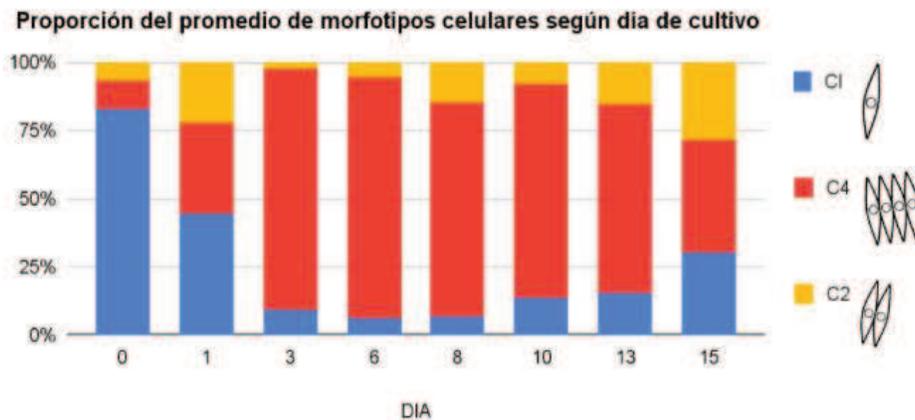


Figura 13 - Cantidad promedio de células totales por mL de cultivo de *Tetradismus* sp. en el tiempo (BBM, 168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz, 25°C, 3 réplicas).

En cuanto al número (Fig. 14 (A)) y proporción de morfotipos celulares (Fig. 14 (B)), al inicio la mayor proporción fue de células individuales (CI), la cual disminuyó a medida que pasaron los días. Desde el día 3 hasta el 8 se observó que la mayor proporción de morfotipos celulares correspondió al de cenobios de 4 células (C4). Desde el día 8 en adelante, se observó una disminución de la proporción de morfotipos C4 y un incremento en la proporción de células individuales nuevamente.



(A)



(B)

Figura 14 - Número promedio (A) y proporción (B) de la frecuencia de morfotipos CI (células individuales), C4 (cenobios de 4 células) y C2 (cenobios de 2 células) en cultivos de *Tetrademus* sp. en el tiempo (BBM, 168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de luz, 25°C, 3 réplicas).

Caracterización morfológica y genética de la cepa aislada *Tetradismus* sp.

Caracterización morfológica de la cepa aislada *Tetradismus* sp.

Por cuanto se pudo observar, en cultivos jóvenes las células presentaron morfología claramente ahusada, y en caso de observarse agrupaciones, eran de cenobios de 4 individuos. Con el paso del tiempo, las células adoptaron morfologías particulares, que manifestaron por ejemplo aumento de tamaño de células individuales. Además, se observó una transición en la coloración del cultivo desde tonalidades verdes hacia un color anaranjado, que refleja disminución de concentración de clorofila e incremento de carotenoides (Fig. 15 (B)).

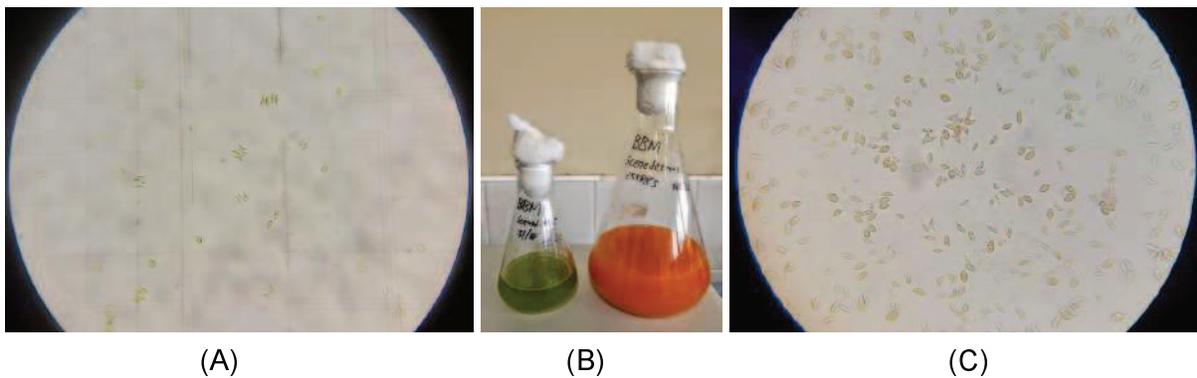


Figura 15 - (A) Células de cultivos jóvenes de *Tetradismus* sp. (400X) pertenecientes a un cultivo verde (Fig (B), izquierda). En (C), células de un cultivo de *Tetradismus* sp.(400X) de color anaranjado (Fig (B), derecha).

Las formas “regulares” (Fig. 16) presentaron morfología ahusada ($12.302 \pm 1.582 \mu\text{m}$ de largo por $3.723 \pm 0.480 \mu\text{m}$ de ancho). En el cloroplasto de cada célula se observó un pirenoide circular en posición central, con cierta tendencia hacia la parte cóncava, destacándose por su contorno verde más oscuro ($1.434 \pm 0.205 \mu\text{m}$ de diámetro). No se observaron espinas ni mucilago en células individuales (C1) ni en los cenobios. Los cenobios, aunque se han detectado de 2 células (C2), suelen ser de 4 células (C4) agrupadas de manera intercalada, con una longitud total medida desde la primera hasta la última célula de $11.944 \pm 1.258 \mu\text{m}$ y un ancho de $11.395 \pm 0.652 \mu\text{m}$, con pirenoides de $1.106 \pm 0.195 \mu\text{m}$ diámetro. El “ancho” del cenobio corresponde al largo de una de sus células constituyentes, las que tuvieron un ancho promedio de $2.731 \pm 0.294 \mu\text{m}$.

Forma en que se tomaron las medidas de cenobios:

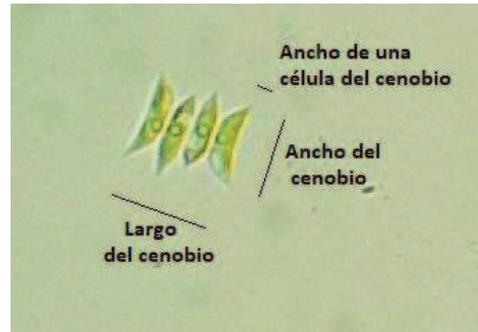
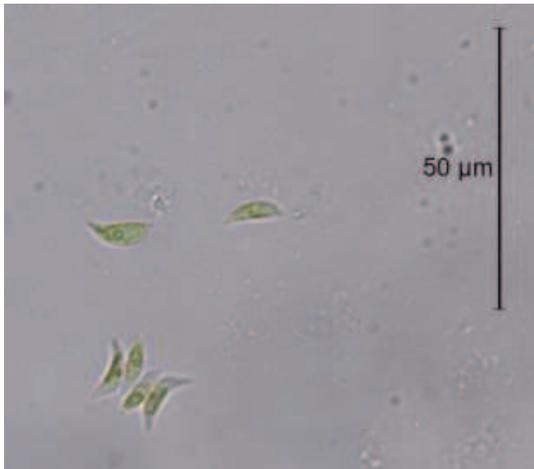


Figura 16 - Células regulares de la cepa de *Tetradesmus* sp. aislada.

Sobre las células individuales en estrés fisiológico (Fig. 17), puede decirse que presentaron mayor tamaño que células no estresadas ($14.871 \pm 1.902 \mu\text{m}$ de largo por $6.702 \pm 2.105 \mu\text{m}$ de ancho) sobre todo en el ancho promedio. La matriz celular se observó granulosa, con gran cantidad de lo que se sugiere pueden ser lípidos almacenados. En numerosas ocasiones se observaron morfologías como las representadas en la Fig. 18, células individuales con 3 extremos. No se observó el pirenoides de manera clara como en las regulares, pero sí se pudo apreciar el espacio correspondiente en el cloroplasto. En cuanto al agrupamiento, puede decirse que la mayor parte de las células fueron observadas solitarias o de a pares, escasos cenobios de 4 células fueron registrados. Estos últimos tuvieron unas dimensiones promedio de $14.904 \pm 2.823 \mu\text{m}$ de largo por $12.244 \pm 1.160 \mu\text{m}$ de ancho, siendo el ancho promedio de las células constituyentes de $3.639 \pm 0.402 \mu\text{m}$.

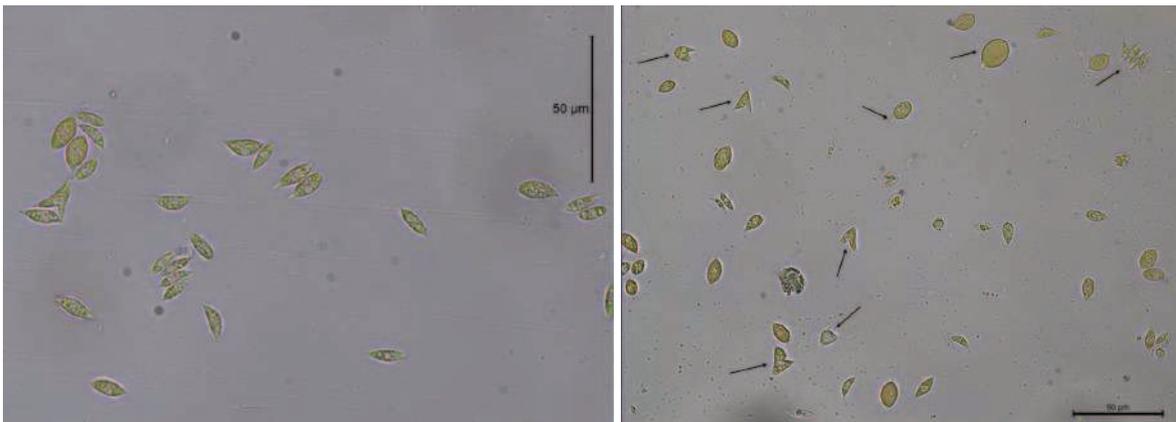


Figura 17- Morfologías en estado de estrés fisiológico en células de la cepa aislada *Tetradesmus* sp. (Leica DM3000 LED 400x).

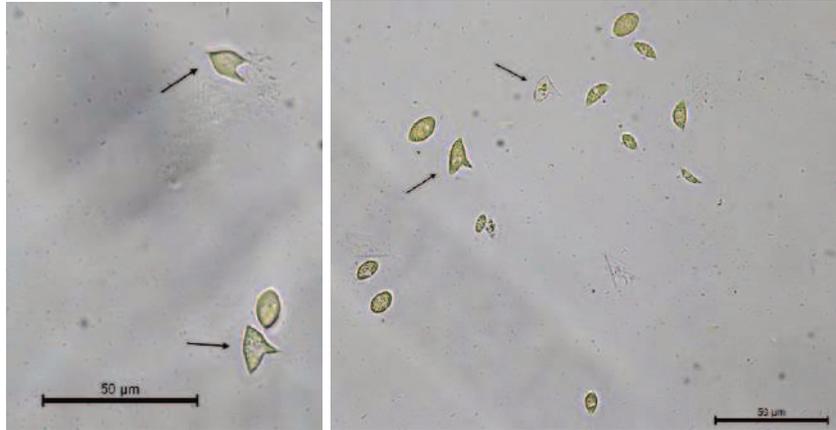


Figura 18 - Morfologías en estado de estrés fisiológico en células de la cepa aislada *Tetradesmus* sp. (Leica DM3000 LED 400x), donde se observan detalladamente individuos con tres extremos.

La comparación de las medias de las variables ancho y longitud en los dos estados celulares (Fig. 19) mostró diferencias significativas en los dos casos. Las medias de los anchos fueron estadísticamente diferentes ($p=2.331 \cdot 10^{-05}$) según test t de comparación de medias independientes con varianzas diferentes. Sobre las longitudes, prácticamente el 100% de las de las células regulares estuvieron por debajo de la mediana de la longitud de las células estresadas. El test t de comparación de medias independientes con varianzas iguales, arrojó que las medias de las longitudes son estadísticamente diferentes ($p = 7.479 \cdot 10^{-05}$).

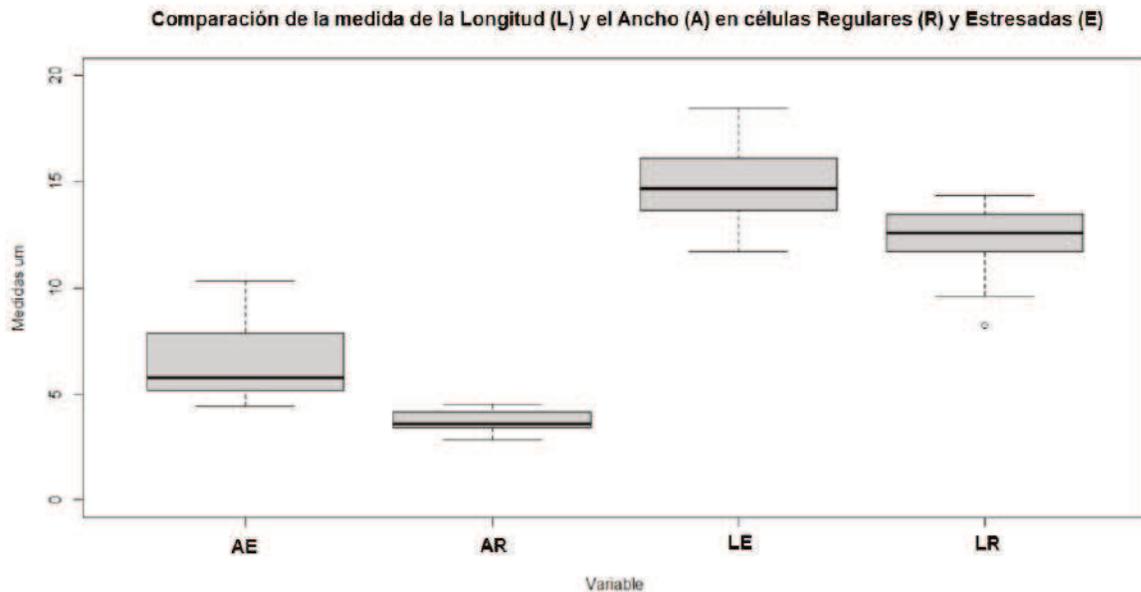


Figura 19 - Diagrama de cajas que representa la distribución de las medidas del ancho y la longitud de células de la cepa aislada *Tetradesmus* sp. bajo distintas condiciones fisiológicas.

Además, se detectaron en numerosas ocasiones las formas reproductivas de la cepa aislada (Fig. 20). Se observaron tanto en células individuales como en cenobios de 4 células las divisiones celulares internas que luego derivaron en un nuevo cenobio. Se detectó visualmente que células en estado reproductivo presentaban en general mayor tamaño que las células jóvenes.



Figura 20 - Células de *Tetradesmus* sp. en estado reproductivo.
(Leica DM 3000 LED 400x).

Caracterización genética de la cepa aislada *Tetradesmus* sp.

La secuenciación del gen 18S ARNr arrojó picos claros en el electroferograma, lo que indica buena secuenciación del ADN extraído (Figs. 21 y 22). El fragmento amplificado fue de 1333 pb, pero debido a que el secuenciador no recibe buena señal en los extremos, se seleccionó la zona de mayor calidad del fragmento para su comparación con secuencias de bases de datos públicas. De esta manera, se utilizó un fragmento de 993 pb (comprendido entre las 107 y 1100 pb). La asignación taxonómica se realizó con la base de datos en NCBI. La cepa aislada presentó un 99.7% de similitud con numerosos hits del género *Tetradesmus* o *Scenedesmus*, siendo la mayoría de especies *dimorphus* y *obliquus* (Fig. 23). Se realizó una búsqueda dentro de los resultados obtenidos para utilizar de referencia una cepa cultivada “strain” (y no una secuencia proveniente de aislamiento de ADN ambiental “isolated”) legítimamente publicada. De esta manera se seleccionó la cepa *Tetradesmus obliquus* CCAP276/3A, publicada por Bradley et.al (2016). Dicha cepa fue aislada de un sistema de agua dulce y cultivada en condiciones axénicas (cultivo monoespecífico que proviene de una sola célula) en medio EG:JM. Esta cepa presenta como sinónimos taxonómicos a *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata 2000 y a *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing

1833. Al momento de alinear las secuencias (Fig. 24), se observaron dos gaps (pb 921 y pb 944), que indican la ausencia de los nucleótidos que se corresponden con la secuencia de referencia en esas posiciones. Puede decirse entonces que la especie aislada presenta una alta similitud nucleotídica (en base al gen 18S rARN) con una cepa del género *Tetradasmus*, aunque no se encontró en las bases de datos una especie o variante de referencia de la especie que coincida al 100% con la aislada.

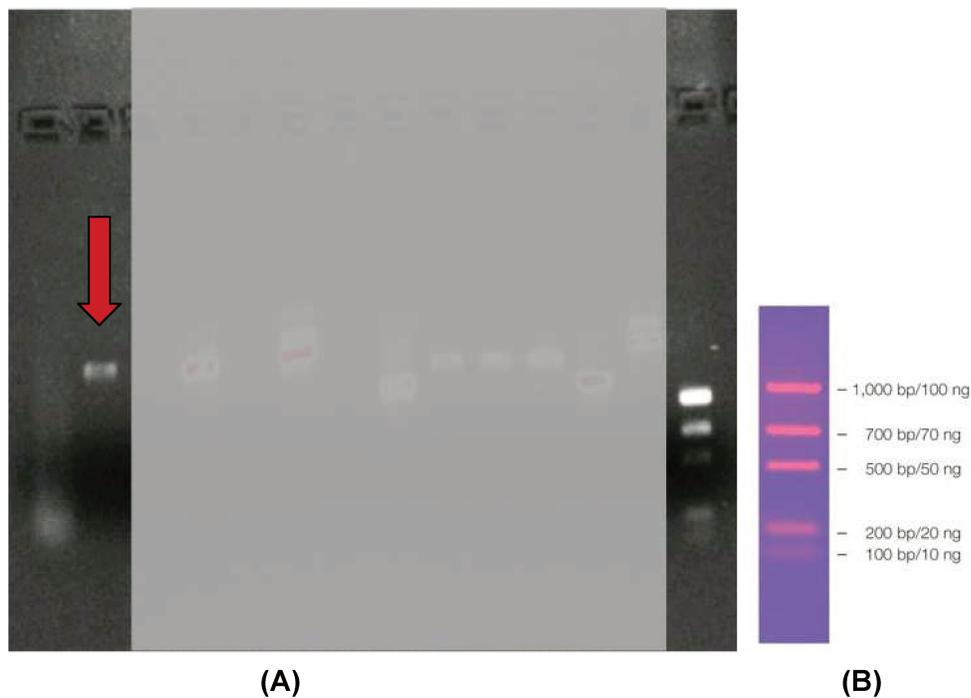


Figura 21 - Gel de agarosa con tinción gel red en que se señala el fragmento del gen 18S ARNr amplificado de la cepa aislada (A). El ladder de referencia (B) confirma el tamaño de 1300 pb aproximadamente.


```

Query: None Query ID: 1c1|Query_60363 Length: 993

>Tetrademus obliquus strain CCAP 276/3A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: KU900221.1 Length: 1792
Range 1: 130 to 1124

Score:1820 bits(985), Expect:0.0,
Identities:992/995(99%), Gaps:2/995(0%), Strand: Plus/Plus

Query 1      CTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCT 60
            |||
sbjct 130    CTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCT 189

Query 61     GGAAGGGACGTATATATTAGATAAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATC 120
            |||
sbjct 190    GGAAGGGACGTATATATTAGATAAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATC 249

Query 121    ATGATATCTTCACGAAGCGCATGGCCTTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCC 180
            |||
sbjct 250    ATGATATCTTCACGAAGCGCATGGCCTTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCC 309

Query 181    TATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGCCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTA 240
            |||
sbjct 310    TATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGCCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTA 369

Query 241    GGGTTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGG 300
            |||
sbjct 370    GGGTTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGG 429

Query 301    CGCGCAAATTAACCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCA 360
            |||
sbjct 430    CGCGCAAATTAACCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCA 489

Query 361    TTTTATGCTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAG 420
            |||
sbjct 490    TTTTATGCTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAG 549

Query 421    GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGGAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGT 480
            |||
sbjct 550    GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGGAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGT 609

Query 481    TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAG 540
            |||
sbjct 610    TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAG 669

Query 541    TACTGCTATGGCCTTCCTTTCTGTCCGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTC 600
            |||
sbjct 670    TACTGCTATGGCCTTCCTTTCTGTCCGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTC 729

Query 601    GGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATA 660
            |||
sbjct 730    GGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATA 789

Query 661    CTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAG 720
            |||
sbjct 790    CTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAG 849

Query 721    TAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTG 780
            |||
sbjct 850    TAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTG 909

Query 781    GATTTATGAGAGACGAACTACTGCCAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGA 840
            |||
sbjct 910    GATTTATGAAAGACGAACTACTGCCAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGA 969

Query 841    ACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGC 900
            |||
sbjct 970    ACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGC 1029

Query 901    CGACTAGGGATTGGCGAATG-TTTTTTAATGACTTCGCCAGCA-CTTATGAGAAATCAAA 958
            |||
sbjct 1030   CGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTAATGACTTCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAA 1089

Query 959    GTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGC 993
            |||
sbjct 1090   GTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGC 1124

```

Figura 24 - Alineamiento de la secuenciación del gen 18S ARNr de la cepa aislada con la secuencia de referencia escogida (*Tetrademus obliquus* strain CCAP 276/3a).

La asignación filogenética de la cepa aislada, se realizó sobre un árbol de referencia construido con secuencias parciales del gen 18S ARNr. El árbol estuvo conformado por 45 secuencias, representado por diferentes grupos de algas relacionadas filogenéticamente con *Tetradismus* (Fig. 25).

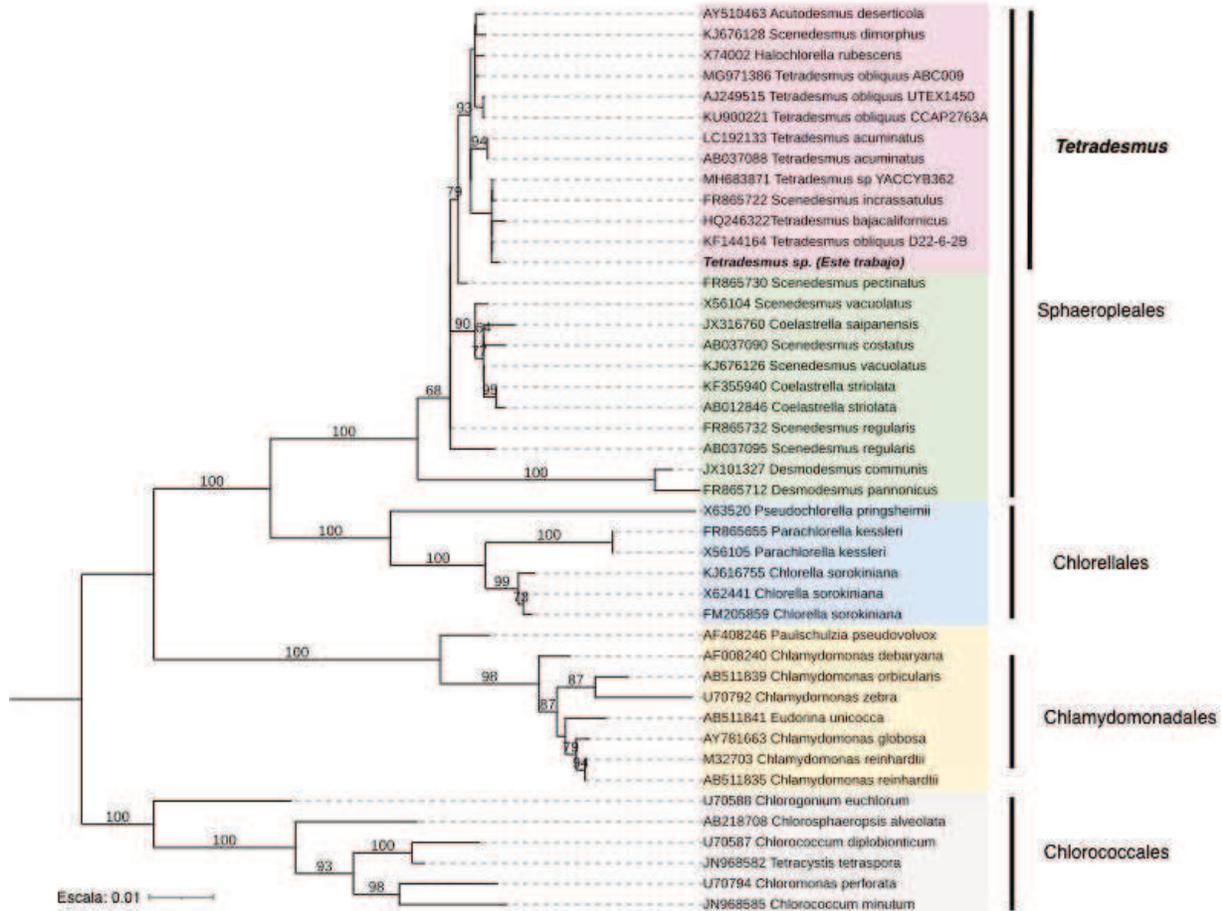


Figura 25 - Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido (RAxML). A la derecha, se incorporaron los nombres de los cuatro principales clados y un subclado exclusivo para el género *Tetradismus*. El número en los nodos representa el soporte estadístico (1000 repeticiones).

Se observó una robusta conformación de clados, con soporte estadístico máximo (100) para Sphaeropleales, Chlorellales, Chlamydomonadales y Chlorococcales. La cepa aislada quedó asignada filogenéticamente dentro del clado Sphaeropleales, subclado “*Tetradismus*” con alto soporte estadístico (93% de *bootstrap*).

Caracterización fisiológica de la cepa de microalga nativa aislada

Propiedades ópticas de la cepa aislada *Tetradasmus* sp.

Se graficaron los coeficientes intrínsecos de absorción (Fig. 26) y dispersión (Fig. 28), y los específicos de absorción (Fig. 27) y dispersión (Fig. 29) para 4 tiempos diferentes. Los coeficientes específicos se obtuvieron multiplicando a los coeficientes intrínsecos por la biomasa correspondiente al día evaluado.

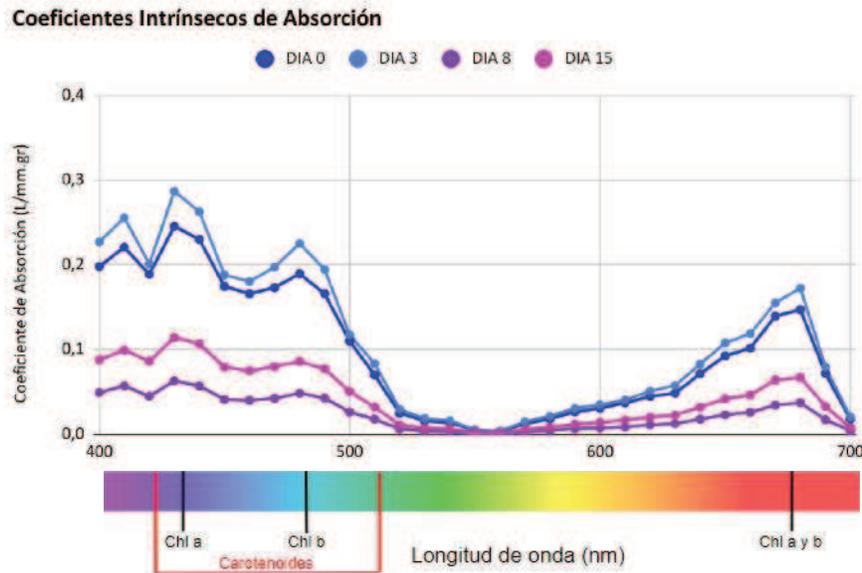


Figura 26 - Coeficientes intrínsecos de absorción promedio para la cepa aislada *Tetradasmus* sp. en 4 tiempos diferentes. La tabla con los valores promedio de las 3 réplicas y sus respectivas desviaciones estándar se encuentran en Anexo 4.

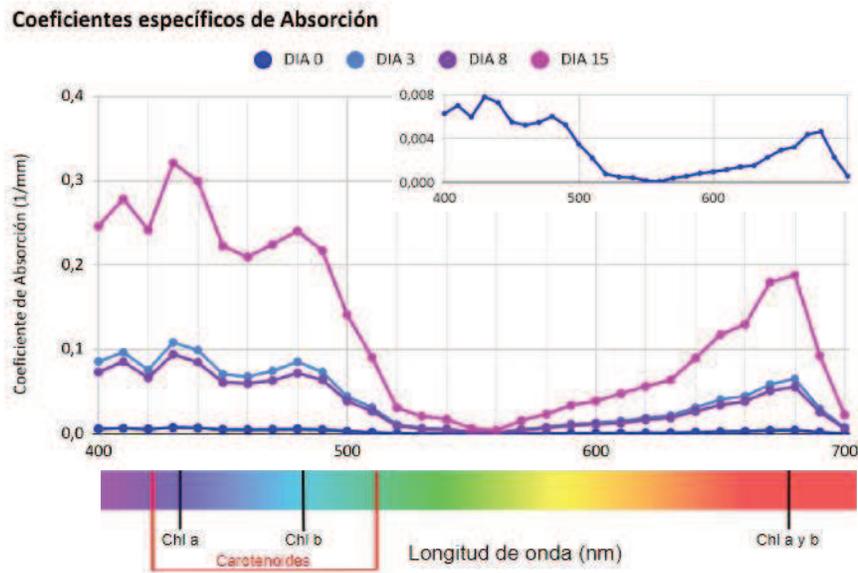


Figura 27 - Coeficientes específicos de absorción (intrínsecos afectados por la biomasa del día evaluado) para *Tetradesmus* sp. en 4 instantes de tiempo. Se incorporó una subgráfica que muestra el mismo patrón para el día 0, no apreciable debido a la escala en la gráfica original que la contiene. La tabla con los valores promedio de las 3 réplicas y sus respectivas desviaciones estándar se encuentran en Anexo 4.

En el caso de los coeficientes intrínsecos (Fig. 26) se observó que el pico en los 670 nm correspondiente a las clorofilas a y b disminuyó entre los primeros y los últimos días de cultivo. No se observó un aumento notable en las zonas de absorción de carotenoides, aunque se detectó que en ese rango (420-510 nm) la disminución de los picos de las clorofilas a y de las b fueron menos pronunciados.

En los resultados intrínsecos afectados por la biomasa del cultivo (Fig 27), se observó un incremento en la absorción debida al aumento de la variable biomasa en el tiempo. La absorción promedio considerando los coeficientes específicos en todo el espectro aumentó desde el día 0 (0.00312 ± 0.00247 1/mm) hasta el día 15 (0.12630 ± 0.10033 1/mm). La desviación fue alta justamente por los picos y por las zonas de absorción tan bajas.

En ambas figuras es clara la no absorción en rango verde (500-600 nm), color que es reflejado por estos microorganismos.

Coefficientes intrínsecos de Dispersión

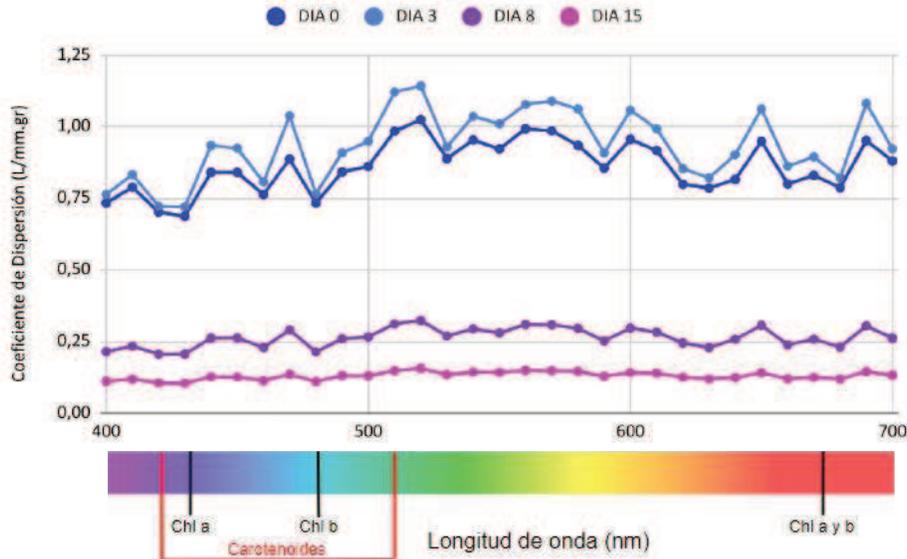


Figura 28 - Coeficientes intrínsecos de dispersión promedio para la cepa aislada *Tetrademus* sp. en 4 tiempos diferentes. La tabla con los valores promedio de las 3 réplicas y sus respectivas desviaciones estándar se encuentran en Anexo 4.

Coefficientes específicos de Dispersión

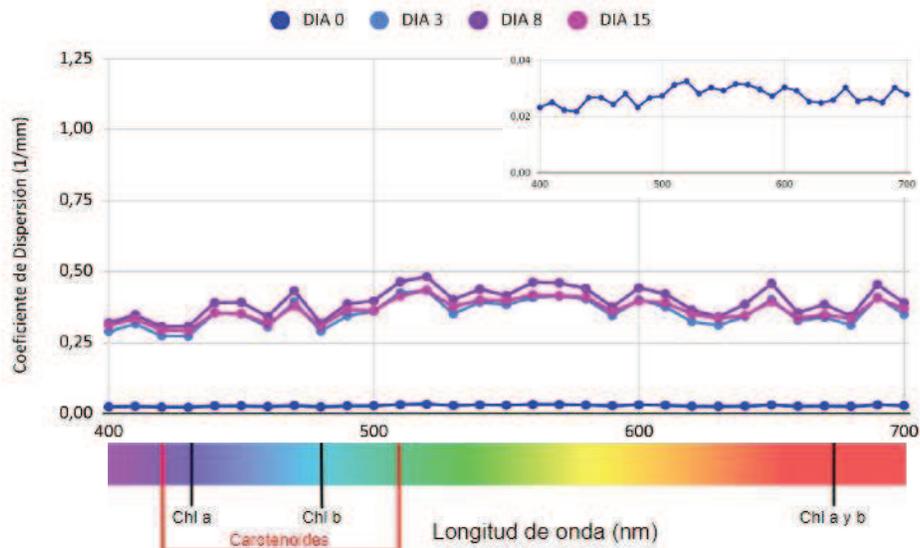


Figura 29 - Coeficientes específicos de dispersión (intrínsecos afectados por la biomasa del día evaluado) para *Tetrademus* sp. en 4 instantes de tiempo. Se incorporó una subgráfica que muestra el mismo patrón para el día 0, no apreciable debido a la escala en la gráfica original que la contiene. La tabla con los valores promedio de las 3 réplicas y sus respectivas desviaciones estándar se encuentran en Anexo 4.

En ambos casos se observó un patrón de dispersión con poca variación en la ordenada, es decir que las distribuciones se podrían ajustar a funciones más bien constantes. No existió una notable diferencia de dispersión en determinados rangos como sí se observa en los coeficientes de absorción. Sin embargo, se pudo apreciar una leve mayor dispersión en el rango de los verdes (500-600 nm).

En general, se observó que los coeficientes de dispersión fueron mayores que los de absorción, y que las zonas de mayor dispersión (entre los 500 y 600 nm) coincidieron con las de menor absorción.

El valor máximo de dispersión específica (0.48170 1/mm) se presentó en el día 8 a 520 nm, mientras que el máximo valor de absorción específica (0.32098 1/mm) se observó en el día 15 a 430 nm.

Evaluación de la producción de biomasa y pigmentos en la cepa aislada *Tetrademus* sp. en relación a la concentración de nitrato e intensidad de luz

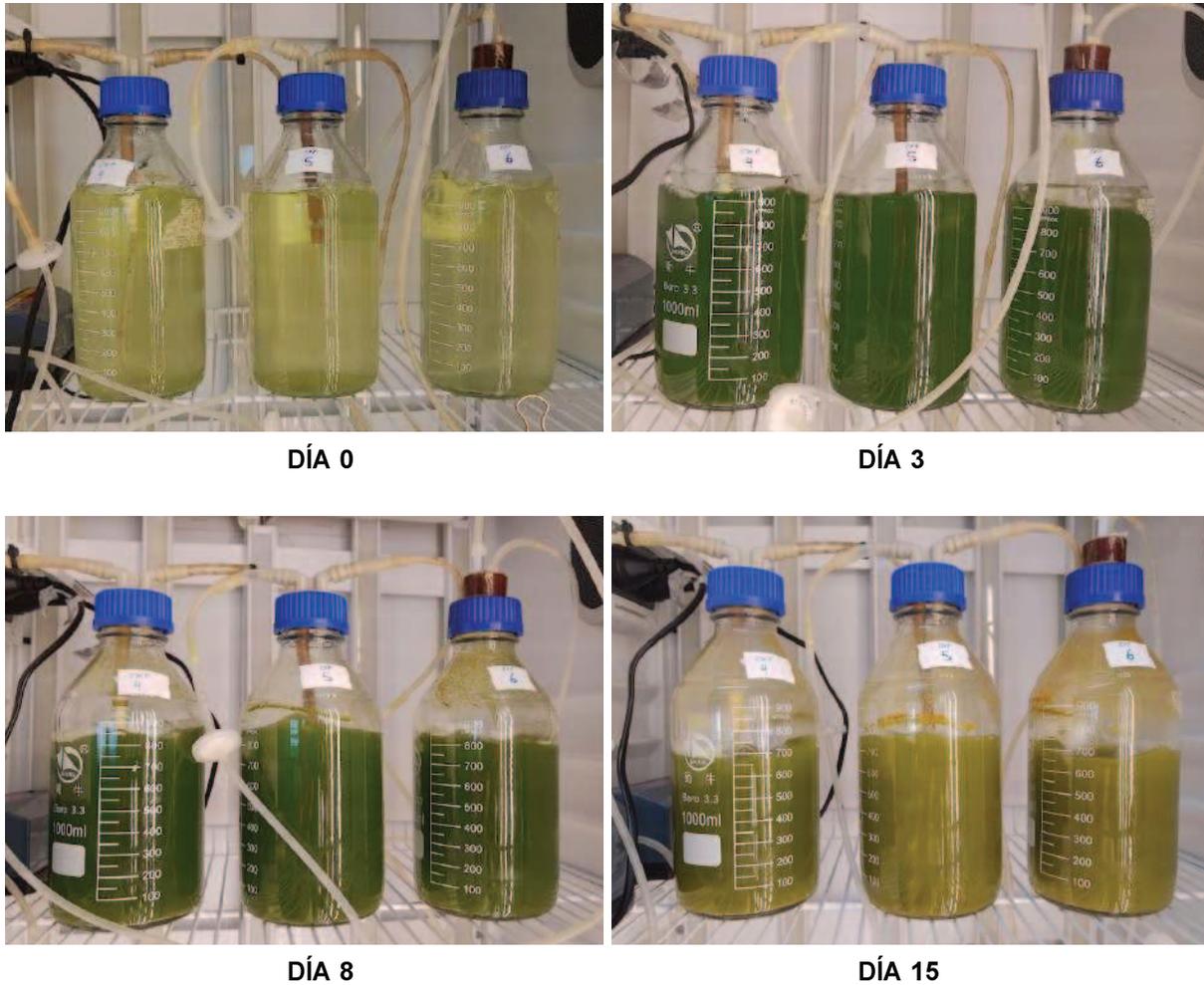


Figura 30 - Experiencias control a los días 0, 3, 8 y 15 del ensayo para evaluar la concentración de pigmentos fotosintéticos y biomasa de *Tetrademus* sp. en el tiempo a diferentes intensidad de luz ($168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y concentración de nitrato ($0.25 \text{ gr}/\text{L}$)

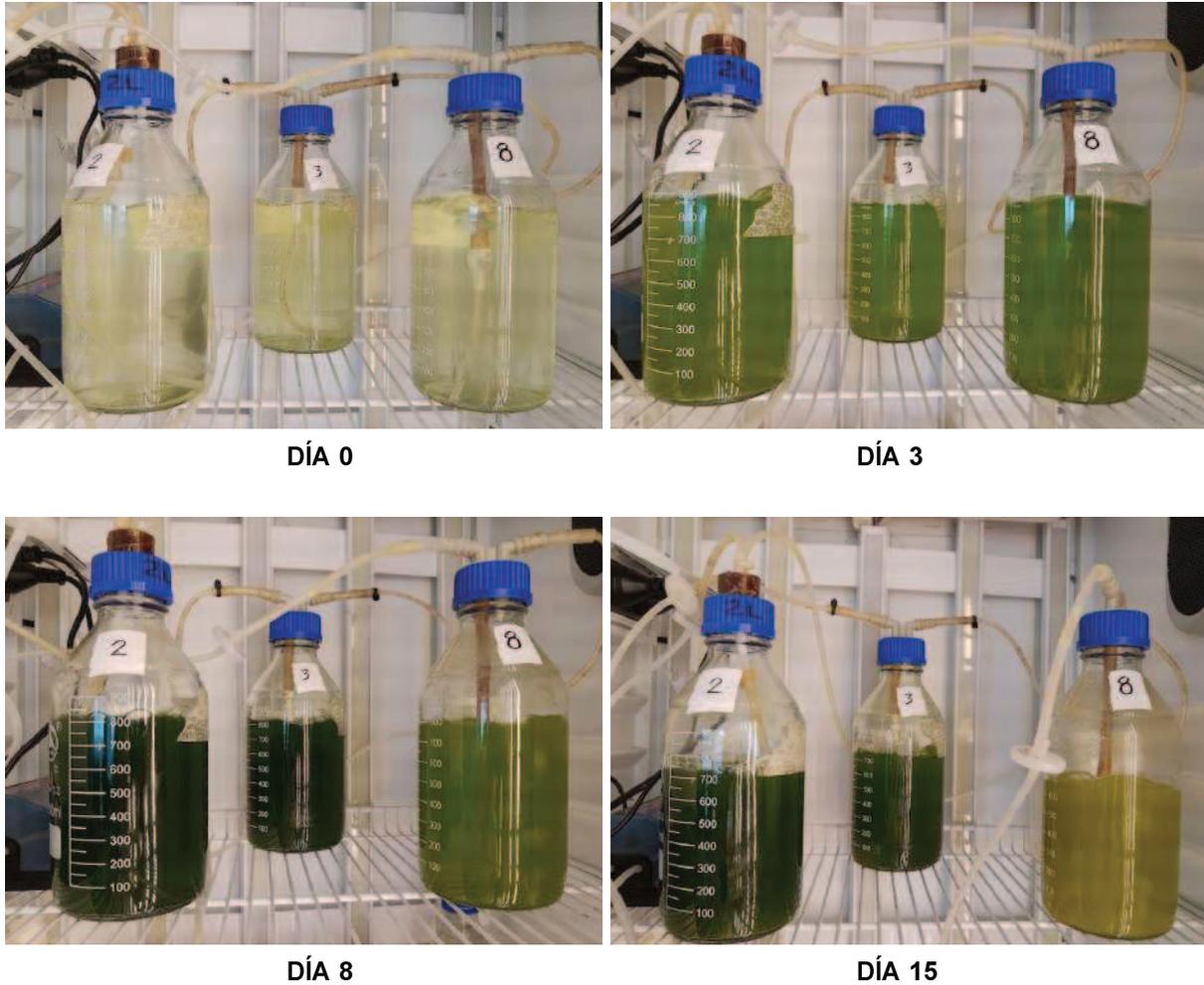


Figura 31 - Experiencias 2, 3 y 8 a los días 0, 3, 8 y 15 del ensayo para evaluar la concentración de pigmentos fotosintéticos y biomasa de *Tetradesmus* sp. en el tiempo a diferentes intensidad de luz ($80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para las EXP 2 y 8: $44 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para la EXP 3) y concentración de nitrato (0.381 gr/L para la EXP 2; 0.25 gr/L para la EXP 3; y 0.119 gr/L para la EXP 8)



DÍA 0



DÍA 2



DÍA 8



DÍA 15

Figura 32 - Experiencias 9, 10 y 12 a los días 0, 3, 8 y 15 del ensayo para evaluar la concentración de pigmentos fotosintéticos y biomasa de *Tetradismus* sp. en el tiempo a diferentes intensidad de luz ($256 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para las EXP 9 y 12; $292 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para la EXP 10) y concentración de nitrato ($0.381 \text{ gr}/\text{L}$ para la EXP 9; $0.25 \text{ gr}/\text{L}$ para la EXP 10; $0.119 \text{ gr}/\text{L}$ para la EXP 12).

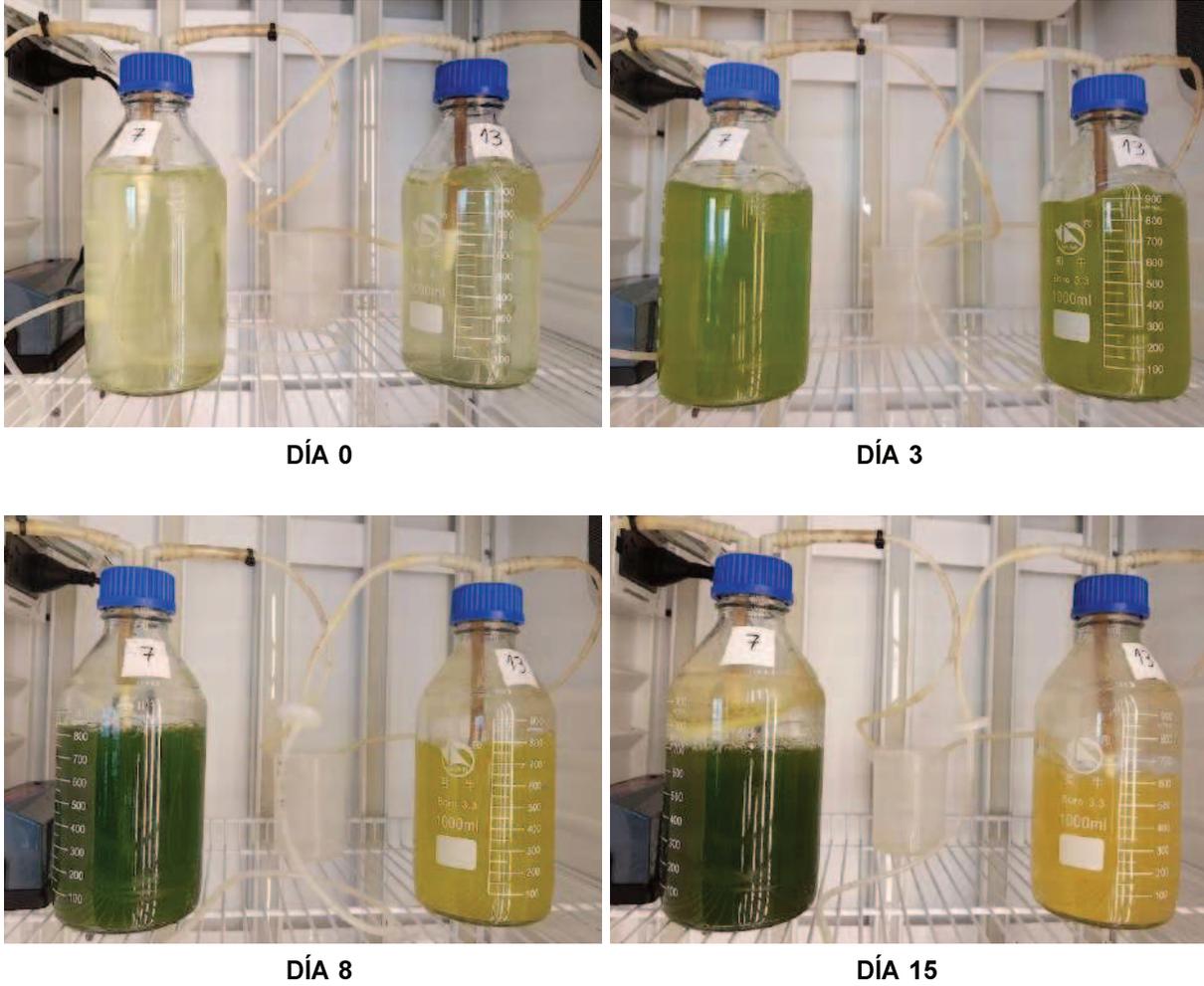


Figura 33 - Experiencias 7 y 13 a los días 0, 3, 8 y 15 del ensayo para evaluar la concentración de pigmentos fotosintéticos y biomasa de *Tetradismus sp.* en el tiempo a diferentes intensidad de luz ($168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para ambos casos) y concentración de nitrato (0.435 gr/L para la EXP 7; 0.065 gr/L para la EXP 13).

Biomasa (eje izquierdo) y Concentración de pigmentos (eje derecho) al día final por experiencia

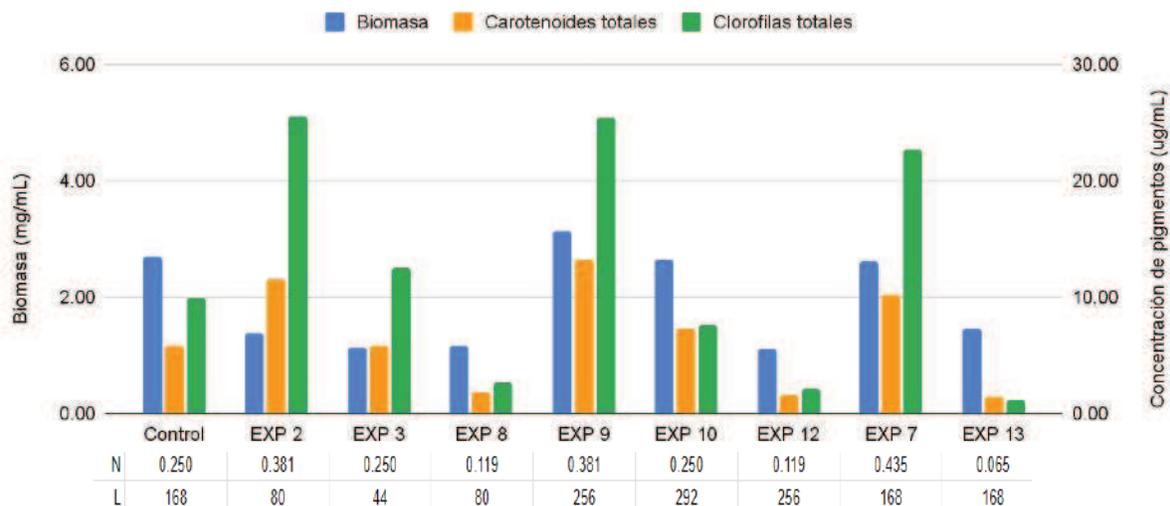


Figura 34 - Cantidad de biomasa y concentración de pigmentos registradas al día final 15 del ensayo por experiencia.). La tabla 1.5.A del Anexo 5 muestra los valores aquí representados.

En la parte inferior se informan los valores de concentración de nitrato (N) en gr/L y de intensidad de luz (L) en $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para cada experiencia.

En las EXP 2, 3, 8, 12 y 13 se observó menos biomasa que el control (2.68 mg/mL), en tanto que en las EXP 10 y 7 se obtuvieron valores muy similares (2.63 y 2.62 mg/mL respectivamente), sólo superados por la EXP 9 (3.13 mg/mL) en la cual se cuantificó el valor máximo de biomasa al día 15. El mínimo valor de biomasa (1.1 mg/mL) se registró en la EXP 12. Éstas EXP 9 y 12 tuvieron la misma intensidad de luz ($256 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) pero difirieron en la concentración de nitrato (0.381 y 0.119 gr/L respectivamente). Si se comparan los resultados de la EXP 12 (0.119 gr/L, $256 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) con la 8 (0.119 gr/L, $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y la 3 (0.250 gr/L, $44 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), se observa que en general los resultados para la EXP 12 fueron muy similares a la EXP 8, que aunque tuvieron la misma concentración de nitrato (0.119 gr/L) difirieron ampliamente en la intensidad de luz (256 y $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ respectivamente). Además, el valor de biomasa alcanzado en la EXP 3 es similar al observado en las EXP 8 y 12, pero en la primera, la concentración de nitrato fue mayor y la intensidad de luz menor en comparación con las otras dos. Sin embargo, en la EXP 3 se observó una mayor producción de pigmentos. Respecto a la coloración, la cepa en la EXP 3 se mantuvo verde hasta el día final, mientras que en las EXP 8 como en la 12 el color final fue verde-naranja.

En cuanto a la producción de pigmentos, al día final (15 días), la máxima concentración de clorofilas totales fue obtenida en la EXP 2 ($25.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) y 9 ($25.45 \mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que la

mínima (1.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se obtuvo en la EXP 13. La máxima concentración de carotenoides (13.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se obtuvo en la EXP 9, en tanto que en la EXP 13 se registró el mínimo valor de 1.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración máxima y mínima de ambos pigmentos fueron vistas en prácticamente las mismas experiencias (en la 9 los dos máximos y en la 13 los dos mínimos). Los cultivos de las EXP 9 como de la 2 se mantuvieron verdes hasta el día final en FBR, mientras que la cepa en la EXP 13 presentó un color naranja-amarillo. La condición que más varió entre las EXP 9 y 13 fue la concentración de nitrato, pero entre 9 y 2 cambió sólo la intensidad de luz.

Tanto en las EXP 2, 9 y 7, los valores de clorofila y carotenoides medidos fueron mayores que en el control, mientras que en la EXP 3 se obtuvieron mayores valores de clorofila y menores de carotenoides respecto al control, a la inversa que la EXP 10 que registraron valores mayores de carotenoides y menores de clorofila respecto al control. En las EXP 9 y 2 como en la 7, se registraron los valores más altos de clorofilas y carotenoides. En estos 3 casos la concentración de nitrato fue elevada, aunque la intensidad de luz fue variable. En estos 3 casos el color de la cepa en el día final fue verde.

En las EXP 13 y 2, se obtuvieron valores similares de biomasa (1.475 y 1.387 mg/mL respectivamente), pero hubo una amplia diferencia en la cantidad de pigmentos. La EXP 2, con menor intensidad de luz y mayor concentración de nitrato, presentó cantidades mayores (11.59 $\mu\text{g car}/\text{mL}$ y 25.5 $\mu\text{g chl}/\text{mL}$) a las registradas en la EXP 13 (1.43 $\mu\text{g car}/\text{mL}$, 1.13 $\mu\text{g chl}/\text{mL}$). En la EXP 13 se observaron bajos valores de concentración de pigmentos en relación a la EXP 7, que fue cultivada con la misma intensidad de luz (168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) pero con amplia diferencia en la concentración de nitrato (0.065 y 0.435 gr/L respectivamente). La EXP 7 fue la que obtuvo una de las mayores concentraciones de pigmentos en relación al resto de las EXP.

En las EXP 9 y 10, se observaron valores de biomasa relativamente comparables (3.13 y 2.6 mg/mL); por otro lado, en la EXP 9 se registraron valores de concentración de pigmentos notoriamente superiores, sobre todo en clorofilas (25.45 y 7.59 $\mu\text{g chl}/\text{mL}$ respectivamente). La cepa en la EXP 9, cultivada con mayor concentración de nitrato y menos intensidad de luz que la EXP 10, se mantuvo de color verde, mientras que en la EXP 10 se tornó de color naranja.

La cepa en las EXP 2 y 3 se mantuvo verde al día final, y aunque se obtuvieron valores de biomasa similares (1.38 y 1.13 mg/mL respectivamente) se observó una mayor producción de clorofila en la EXP 2 (11.59 $\mu\text{g chl}/\text{mL}$), que fue cultivada con mayor concentración de nitrato y una leve mayor intensidad de luz, aunque menor a la del control.

En líneas generales se observó que en las cepas de las EXP sometidas a la misma intensidad de luz, se produjo mayor concentración de pigmentos a mayor concentración de nitrato. Tal es el caso de las EXP Control, 7 y 13; las EXP 2 y 8; y las EXP 9 y 12.

En el caso de las experiencias cultivadas con igual concentración de nitrato, se detectó que los resultados de producción de pigmentos no se alteraron notablemente con los cambios en la intensidad de luz, aunque sí para el caso de la biomasa.

Rendimiento de Biomasa (eje izquierdo) y Concentración de pigmentos (eje derecho) al día final por experiencia

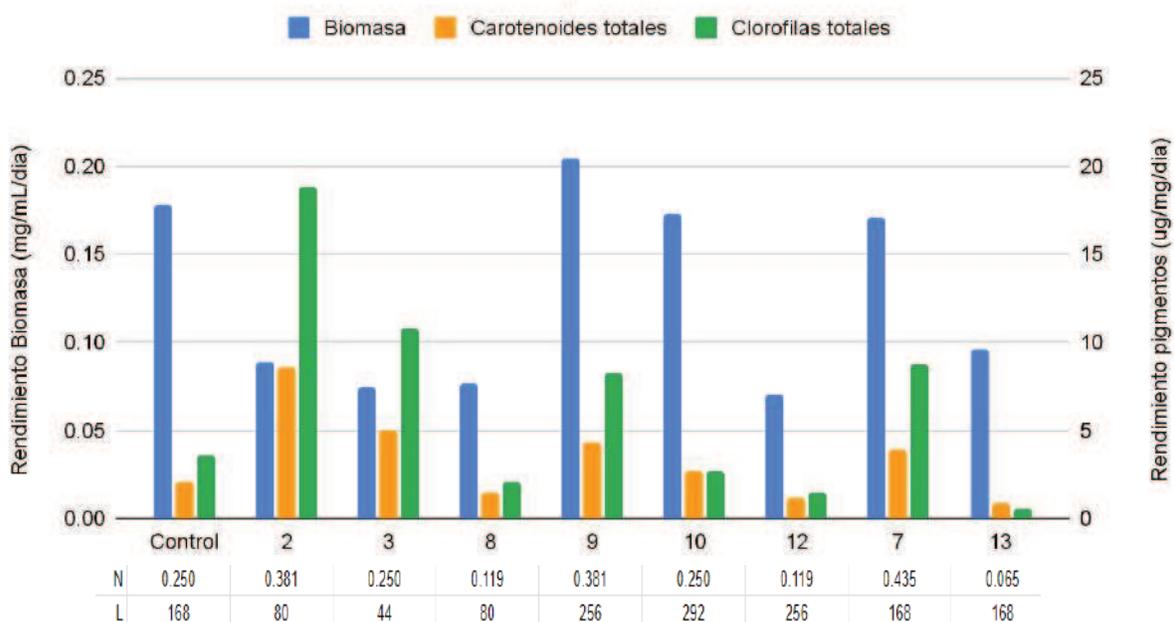


Figura 35 - Gráfica del rendimiento en la producción de biomasa y concentración de pigmentos por experiencia. La tabla 2.5.A del Anexo 5 muestra los valores aquí representados. En la parte inferior se informan los valores de concentración de nitrato (N) en gr/L y de intensidad de luz (L) en $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para cada experiencia.

El rendimiento máximo tanto de clorofilas ($18.84 \mu\text{g chl}/\text{mL}/\text{día}$) como de carotenoides ($8.87 \mu\text{g car}/\text{mL}/\text{día}$) fue observado en la EXP 2, en condiciones de baja intensidad de luz y elevada concentración de nitrato ($80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y $0.381 \text{ gr}/\text{L}$). A su vez, el rendimiento mínimo en la producción de pigmentos ($0.837 \mu\text{g car}/\text{mL}/\text{día}$ y $0.525 \mu\text{g chl}/\text{mL}/\text{día}$) fue observado en la EXP 13, en condiciones de intensidad de luz media y baja concentración de nitrato ($168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y $0.065 \text{ gr}/\text{L}$). Estas dos experiencias obtuvieron similar rendimiento de biomasa, aunque fue un poco más elevado en EXP 13 (0.096 por sobre $0.089 \text{ mg}/\text{mL}/\text{día}$), cultivada a mayor intensidad de luz y menor concentración de nitrato. A pesar de la máxima producción de pigmentos, en la EXP 2 se observó un bajo rendimiento de biomasa (por debajo de las EXP Control, 9, 10, 7 y 13).

Los mayores rendimientos de clorofila fueron obtenidos en las EXP 2, 3, 9 y 7, que fueron cultivadas con alta concentración de nitrato, excepto en el caso de la EXP 3, donde la concentración era equivalente al control, pero la intensidad de luz fue menor.

El máximo rendimiento de biomasa (0.205 mg/mL/día) se observó en la EXP 9, registrándose valores muy superiores al valor mínimo observado en la EXP 12 (0.071 mg/mL/día), que fue cultivada a la misma intensidad de luz (256 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). El mínimo rendimiento de biomasa de la EXP 12 fue similar al de la EXP 8 (0.076 mg/mL/día) cultivada a igual concentración de nitrato y menor intensidad de luz, y de la EXP 3 (0.075 mg/mL/día), cultivada con mayor concentración de nitrato y menor intensidad de luz. Se destaca que la EXP 3 fue la que obtuvo mejor rendimiento de pigmentos de estas tres EXP.

La EXP 10 arrojó resultados similares al Control. Sin embargo si se compara con la EXP 7 (con la que tuvieron similar rendimientos de biomasa) el rendimiento de pigmentos fue mayor en la EXP 7, que fue cultivada a menor intensidad de luz que la EXP 10 y con mayor concentración de nitrato que las EXP Control y 10.

En las EXP con la misma intensidad de luz, se observó que el rendimiento de pigmentos estuvo relacionado a la concentración de nitrato. Para las intensidades de luz de 168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (EXP control, 7 y 13), 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (EXP 2 y 8) y 256 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (EXP 9 y 12), el mayor rendimiento en la producción de pigmentos se observó a mayor concentración de nitrato.

Si en cambio se evalúan las experiencias cultivadas con la misma concentración de nitrato, se observa que el mayor rendimiento de producción de pigmentos ocurrió a menores intensidades de luz. Con una concentración de 0.25 gr/L, de las EXP Control, 3 y 10, se observó mejor rendimiento en la EXP 3, donde la intensidad de luz fue menor. De las EXP 2 y 9, con 0.381 gr/L de nitrato, la EXP 2 que se cultivó a menor intensidad de luz arrojó mejores resultados en cuanto al rendimiento de la producción de pigmentos. Lo mismo se observó en las EXP 8 y 12, cultivadas con 0.119 gr/L de nitrato, donde la EXP 8, expuesta a una intensidad de luz menor, produjo pigmentos con un rendimiento levemente mayor.

Modelos sugeridos por Design Expert

Del análisis exploratorio de los datos, se observó que los mismos cumplieron con los supuestos requeridos para la aplicación del modelo, entre ellos:

- Aleatoriedad de muestras. La toma de muestra fue aleatoria dentro de cada FBR.
- Independencia. Cada EXP fue realizada de manera independiente en un FBR.

-Homocedasticidad. En líneas generales, las varianzas de los residuos se mantuvieron dentro de los límites del test.

-Normalidad. Se cumplió en líneas generales, aunque la mayor normalidad de los residuos existió para el caso de la biomasa.

Tanto la verificación de los supuestos así como resultados de los polinomios, tablas de ajuste y contribución de cada variable a la suma de cuadrados del modelo se encuentran en Anexo 5.

Modelo para rendimiento de carotenoides

Dentro del rango evaluado, el modelo predijo que a menor intensidad de luz y mayor concentración de nitrato el rendimiento en la producción de carotenoides se vería incrementado (Fig. 36). La contribución fue mayor por parte de la luz que aportó un 52.5% de explicación al rendimiento de la producción de carotenoides, por sobre el nitrato (24.3%) y la interacción entre variables (14.88%). El coeficiente cuadrático de la concentración de nitrato aportó en mayor porcentaje (5.59%) que el de luz (2.7%).

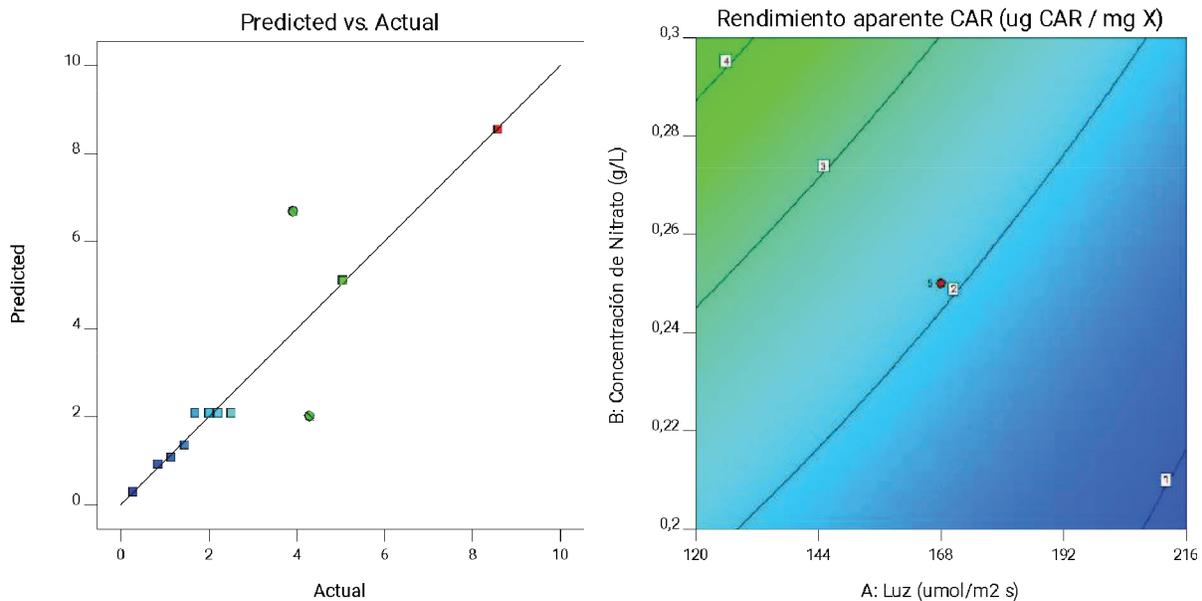


Figura 36 - Ajuste de datos al modelo para el rendimiento de producción de carotenoides totales en *Tetrademus* sp. en función de la intensidad de luz y concentración de nitrato.

Modelo para rendimiento de clorofilas

Dentro del rango evaluado, el modelo predijo que a menor intensidad de luz y mayor concentración de nitrato el rendimiento en la producción de clorofilas se vería incrementado (Fig. 37). En este caso la concentración de nitrato contribuyó con 37.03% de explicación al modelo por sobre el 26.39% de intensidad de luz. Tanto el coeficiente cuadrático de la intensidad de luz (17.44%) como el de nitrato (11.582%), fueron superiores al de la interacción entre variables (7.29%).

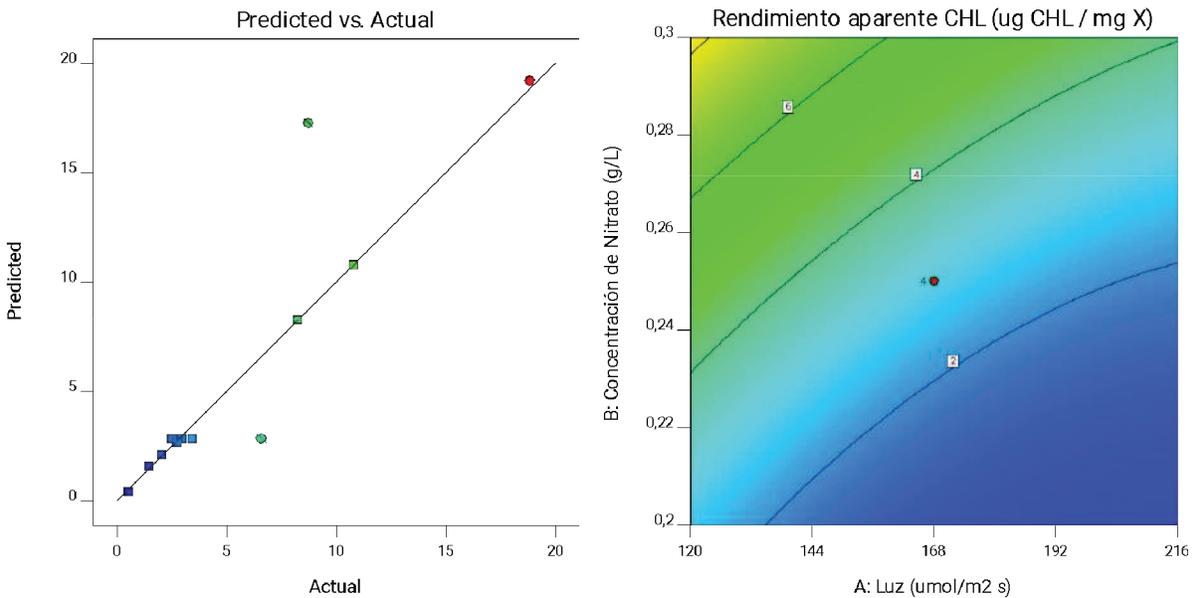


Figura 37 - Ajuste de datos al modelo para el rendimiento de producción de clorofilas totales en *Tetrademus* sp. en función de la intensidad de luz y concentración de nitrato.

Modelo para rendimiento de biomasa

Dentro del rango evaluado, el modelo predijo que a mayor intensidad de luz y mayor concentración de nitrato el rendimiento en la producción de biomasa se vería incrementado (Fig. 38). En este caso se observó que cada variable por separado contribuyó de manera aproximadamente equitativa, con un 25.07% de explicación por parte de la concentración de nitrato que superó levemente al 24.44% de intensidad de luz. El coeficiente cuadrático de la intensidad de luz fue cercano al de los coeficientes lineales (22.53%), y superó tanto al aporte del nitrato (16.19%) y de la interacción entre variables (11.74%).

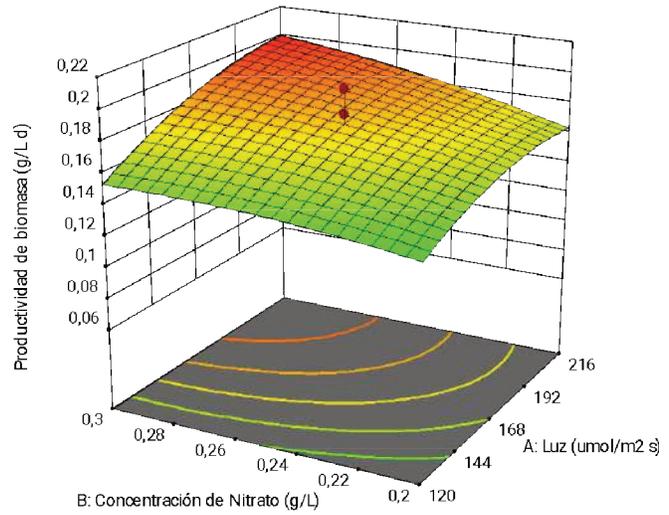
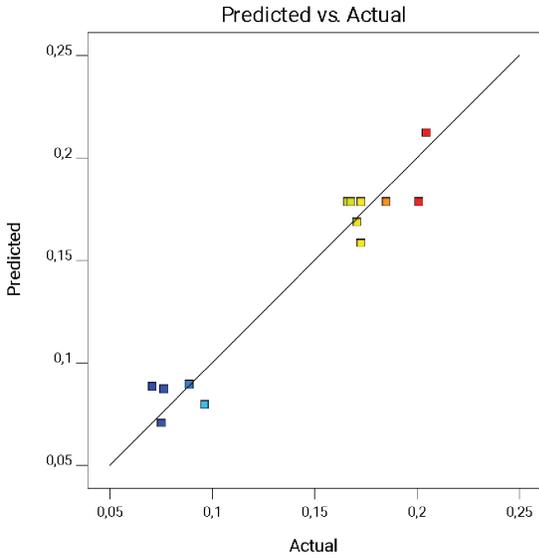


Figura 38 - Ajuste de datos al modelo para el rendimiento de producción de biomasa en *Tetradesmus* sp. en función de la intensidad de luz y concentración de nitrato.

Propiedades Ópticas

A continuación, se representan y comparan sólo algunos estados de determinadas experiencias que mostraron cambios más significativos entre ellas (Fig. 39).

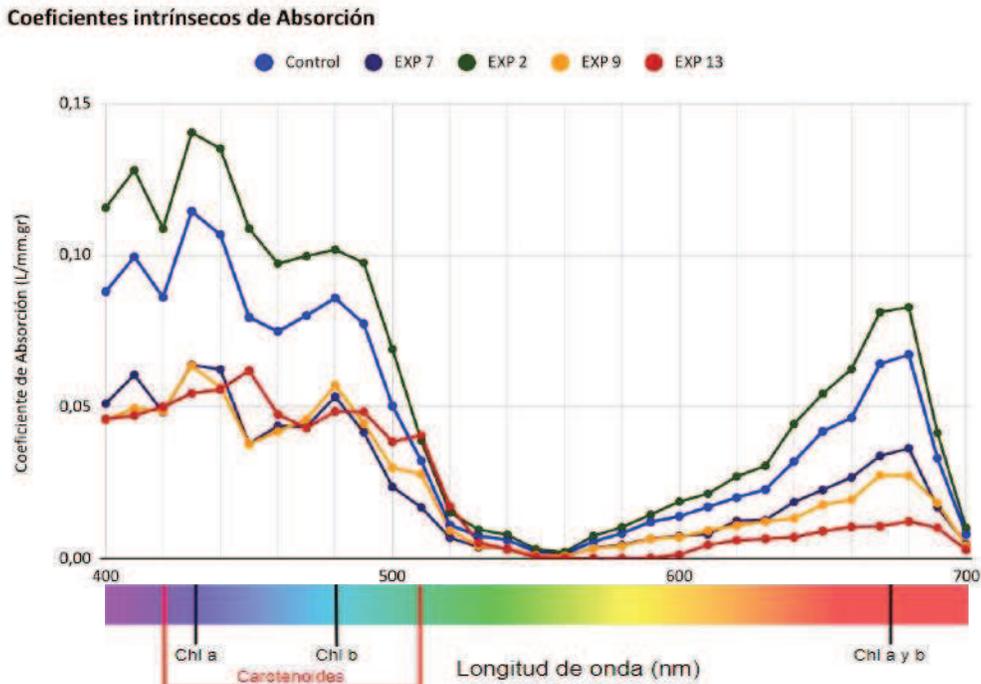


Figura 39- Coeficientes intrínsecos de absorción al día final 15 en las EXP Control, 7, 2, 9 y 13 para *Tetradesmus* sp.

Se observa que tanto la EXP 2 como el Control presentaron una tendencia muy similar en cuanto a la forma de la curva, pero se observó mayor absorción en la primera, que había obtenido mayor rendimiento de clorofilas totales.

El espectro de absorción intrínseco de la EXP 9 y EXP 7 fue similar como también lo fueron sus condiciones de cultivo, rendimientos, cantidades de biomasa y pigmentos al día final. Se observó mayor absorción en la región de las clorofilas *a* y *b* en la EXP 9, de la misma manera que se observó una leve mayor concentración de clorofilas totales al día final. Sin embargo, sus niveles de absorción quedaron por debajo de las EXP 2 y Control.

Es notable una mayor absorción en la región de los carotenoides por parte de la EXP 13, que presentó un destacado pico en 445 nm que coincide con uno de los picos de luteína. Además, se observó mayor absorción que en las EXP 7 y 9 entre los 500 y 510 nm. Cabe destacar que la EXP 13 fue la única donde se obtuvo mayor cantidad de carotenoides que clorofilas, que en parte se puede apreciar de manera notable en los coeficientes específicos de absorción (CEA) en el tiempo (Fig. 40).

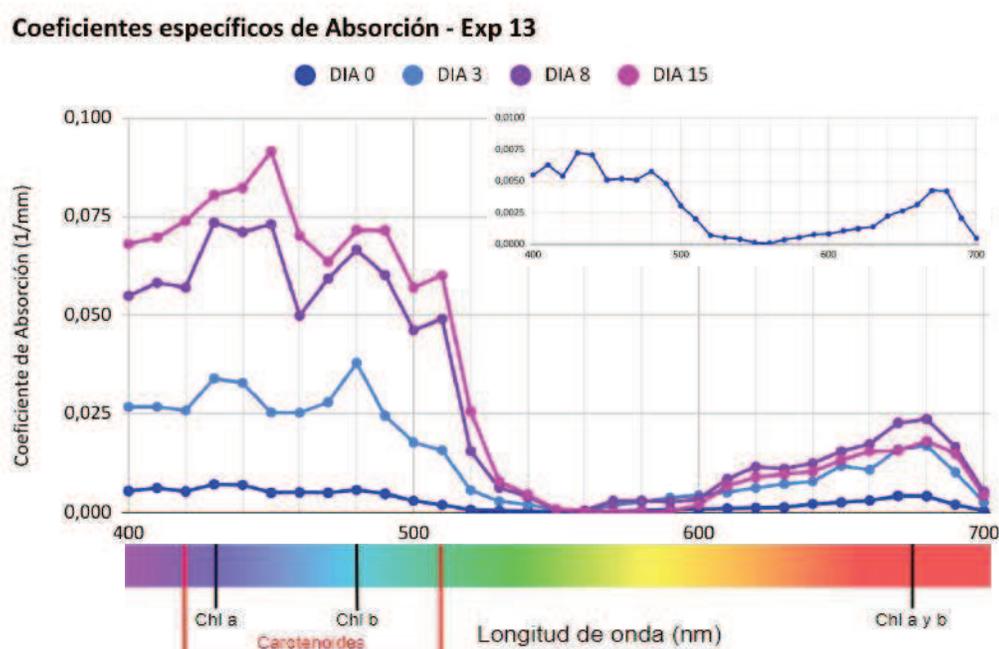


Figura 40 - Coeficientes específicos de absorción para *Tetradismus* sp. en la EXP 13 para 4 instantes de tiempo, correspondientes a los días 0, 3, 8 y 15.

Al día final (Fig. 41) se observa que el control absorbió efectivamente más luz que el resto de las EXP. A este mayor nivel de absorción, le siguieron dos series de grupos en orden descendiente, uno conformado por las EXP 9, 7 y 2, con mayor cantidad de nitrato y clorofilas, y otro por las 3, 8, 12 y 13, con contenido de nitrato y clorofilas medio-bajo.

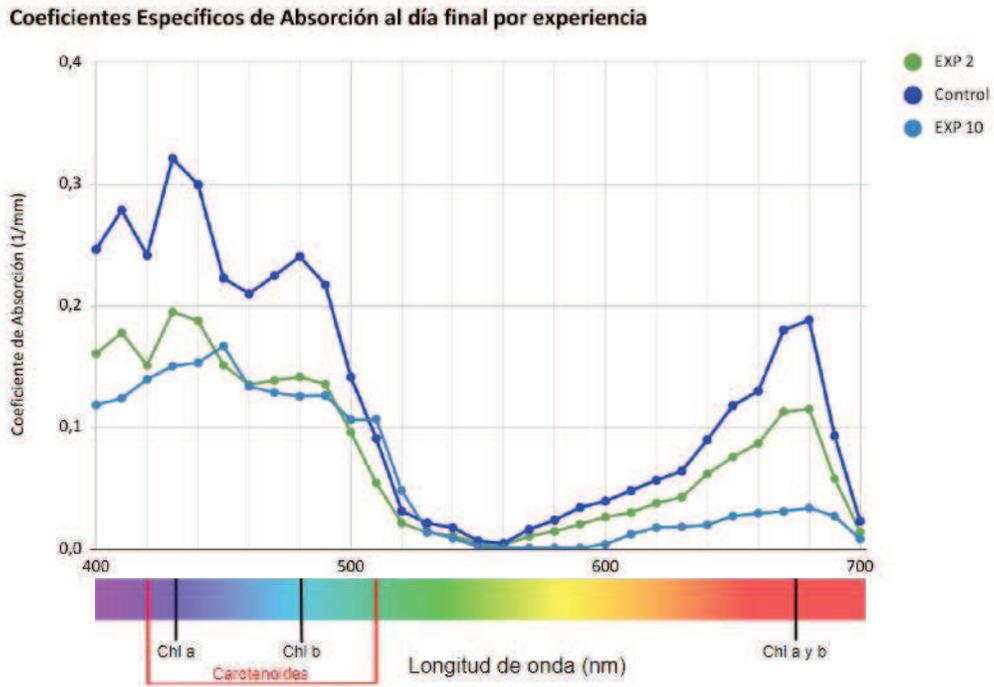
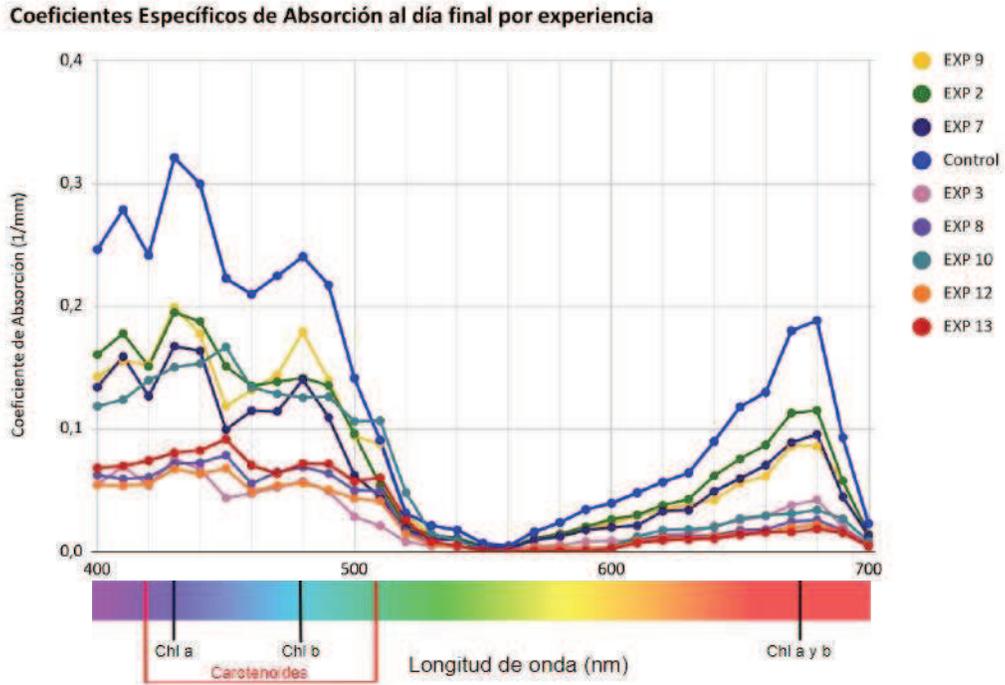


Figura 41 - Coeficientes Específicos de Absorción de suspensiones de *Tetrademus* sp. al día final por experiencia

Para la EXP 10 no se observó un patrón que coincida con uno de los dos grupos mencionados. La EXP2, que se mantuvo siempre de color verde, absorbió más efectivamente la luz (cuya intensidad fue de $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Se observa también que en esta experiencia la absorción en los 670 nm correspondiente a las clorofilas a y b fue mayor que en la 13, la cual se tornó de color anaranjado al día final (Fig. 41, gráfico inferior).

DISCUSIÓN

El cultivo de microorganismos fotosintéticos ha representado un avance en numerosas áreas de la biología, que actualmente se orientan en la investigación aplicada al descubrimiento y desarrollo de productos naturales a partir de los metabolitos que producen (Blunt et al., 2016; Wells et al., 2017). A continuación se discutirán los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos que se plantearon en este trabajo para contribuir al conocimiento en estos campos.

Como establecimiento de las condiciones de cultivo, 25°C y 70% de intensidad lumínica de la cámara de cultivo (168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ en el centro de la misma) fueron adecuadas para propagar cultivos de las 3 especies de microorganismos fotosintéticos evaluadas (*Synechococcus* sp., *A. maxima* y *Tetradesmus* sp.). Sin embargo, si se desean determinar las condiciones de crecimiento óptimo deberían realizarse mayor número de experiencias modificando las variables utilizadas.

El mejor crecimiento de la especie aislada *Tetradesmus* sp. en el medio de cultivo BBM por sobre BG-11 coincide con lo propuesto en Andersen (2005) que sostiene que BBM es un medio propicio para cultivar eucariotas. Que otros autores como Xin et al. (2010) o Chen et al. (2020) hayan empleado BG-11 para cultivar cepas del mismo género de manera efectiva, da cuenta de la plasticidad que pueden presentar estos microorganismos. BG-11 es un medio típico para el cultivo de cianobacterias, lo que se ha podido corroborar en este trabajo con el desarrollo de los cultivos de *Synechococcus* sp. y *A. maxima* en este medio.

En cuanto a la colección de microorganismos fotosintéticos, se la logró constituir con especies de elevado potencial biotecnológico. En líneas generales, *H. pluvialis* se caracteriza por la elevada productividad de astaxantina, *A. maxima* y otras “spirulina” cuentan con numerosos antecedentes en cuanto al desarrollo de suplementos nutritivos, y diversas cepas de *Synechococcus* sp. presentan interés por sus pigmentos fotosintéticos y por ser organismos modelo, al igual que *C. vulgaris* (Meeting, F.B., 1996; Suarez-Montes et al., 2002; Six et al., 2004; Silva et al., 2014; Krienitz et al., 2015; Martins et al., 2021). En el desarrollo de esta tesina se incorporó también a la colección a *Tetradesmus* sp. aislada de una laguna perteneciente a la llanura aluvial del río Paraná, que como cepa nativa tiene potencial para la investigación y desarrollo en estos campos. El hecho de incorporar especies regionales aumenta el valor intrínseco de esta colección.

En cuanto a los cultivos de las dos especies de cianobacterias en FBR, la menor productividad observada de *Synechococcus* sp. en comparación con *A. maxima* se debe a que la primera es una picocianobacteria de muy pequeño tamaño (0.8 a 1.5 μm). En el caso de *A. maxima*, ésta no solo presentó una mayor productividad sino también una mayor variabilidad en los registros de biomasa, lo que puede deberse a la formación de conglomerados celulares causados por la propia fisonomía celular de las cianobacterias filamentosas, los que pueden influir al momento de tomar las muestras. En líneas generales, los valores de biomasa obtenidos para estas cepas cultivadas en BG-11 son acordes a resultados publicados, de 2 mg/mL al día 15 para *A. maxima* (Marrez et al., 2013) y de 1.6-1.7 mg/mL para la fase estacionaria (días 14-15) de *Synechococcus* sp. (Parthiban & Jambulingam, 2023).

Se destaca que el buen ajuste lineal de producción de biomasa respecto al tiempo para ambas especies se da en los primeros 15 días de cultivo. De haberse continuado la experiencia en el tiempo, se habría arribado a un ajuste más bien logístico, marcado por la etapa de estabilización y de posterior decrecimiento (Lee et al., 2015).

La curva de calibrado DO respecto a Biomasa obtenida para *Tetradismus* sp., con un ajuste altamente significativo, permitiría optimizar el tiempo al momento de realizar seguimientos a cultivos de esta especie bajo las condiciones dadas, ya que con sólo determinar la DO a 750 nm, se podría estimar la cantidad de biomasa en el cultivo al menos en los primeros 15 días. Esto es beneficioso debido a que la técnica para determinación de DO es más simple y rápida que la de biomasa. Los mayores contratiempos de la primera técnica podrían surgir al momento de tener que realizar diluciones si la concentración del cultivo lo requiere para obtener un resultado dentro del rango de mayor precisión del instrumento (de 0 a 3). Sin embargo, el tiempo destinado no sería considerable si se compara con el necesario para desarrollar la segunda técnica. Otra ventaja además del tiempo, es el menor volumen de cultivo que se necesita sobre todo en etapas tempranas en las que se deben concentrar al menos 10 mL para obtener un valor de biomasa medible con bajo nivel de error. Una de las desventajas en el empleo de la DO para determinar biomasa por curva de calibrado podría ser que justamente se realiza una estimación del valor de biomasa, y no una medida directa de la variable.

En cuanto a la producción de biomasa de *Tetradismus* sp. cultivada en FBR, se lograron rangos similares a los reportados en bibliografía (Oliveira et al., 2021). El modelo logístico que sigue la producción de biomasa y la cantidad de células a través del tiempo de cultivo es el esperable para un sistema biológico. En relación al crecimiento exponencial del número promedio de células respecto al tiempo de cultivo observado entre los días 3 y 6,

podrían evaluarse en posteriores ensayos si este comportamiento se da, porque el cultivo inicia con un valor de biomasa muy bajo y debido a las sucesivas divisiones asexuales recién a partir del día 3 se produce el crecimiento exponencial; o bien porque las células necesitan atravesar primero una fase de aclimatación de 3 días para desarrollarse exponencialmente independientemente de la cantidad de inóculo inicial. Esto se podría dilucidar repitiendo ensayos donde se varíe la biomasa inicial y se observe el crecimiento, sobre todo entre los días 5 y 7. Además, sería oportuno evaluar si la capacidad de carga del sistema FBR 1L (168 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad de luz, 0.25 gr/L de nitrato, 25°C) se encuentra efectivamente en el orden de los 3 mg/mL o $4 \cdot 10^7$ células, independientemente de la biomasa inicial.

En cuanto a la proporción de ecomorfos en el tiempo, según bibliografía (Smith, 1913; Trainor, 1996) y observaciones personales, puede decirse que los cultivos de *Tetradesmus* sp. que son mantenidos en ceparios tienden a presentar un morfotipo unicelular (CI) por sobre la agrupación en cenobios. Tanto en cultivos como en sistemas naturales, la forma más común de reproducción en *Scenedesmus* (sinónimos taxonómicos con *Tetradesmus* en algunos casos) es asexual (Smith, 1913; Trainor, 1996). Esto involucra la producción de cenobios por medio de 1 a 4 sucesivas divisiones dentro de cada célula, lo que genera la liberación de nuevos cenobios de 2, 4, 8 o 16 células. Cada una de las 4 células de un cenobio reproductivo es independiente y totipotente, por lo que un cenobio de 4 células podría producir hasta 64 células (Smith, 1913). Por otro lado, los morfotipos unicelulares (CI) no son cenobios fragmentados, sino un estado diferente, que surge cuando luego de la división dentro de la madre las células no logran cementarse, ya sea por una falla en la producción de sustancia cementante o bien debido a la generación temprana de espinas u ornamentaciones (en caso de existir en la cepa) que impidan el acoplamiento (Trainor, 1996).

Como los inóculos para iniciar los cultivos en FBR surgieron de cultivos en buen estado, es esperable que al día 0 se haya observado una mayor proporción de células individuales (CI) por sobre los otros ecomorfos. En el día 3 se observó que la mayor proporción de formas celulares correspondió al de cenobios de 4 células (C4). Esto se encuentra relacionado a la biología reproductiva del género antedicha, en la que cada célula es independiente y totipotente para producir los cenobios (Smith, 1913; Trainor, 1996). En consecuencia, la significativa predominancia de cenobios C4 en el día 3 podría explicar en parte el crecimiento exponencial del número de células y biomasa entre el día 3 y 6. A partir del día 6-8 se observó una disminución en la proporción de C4 y un predominio del morfotipo CI. Una posible explicación es que el morfotipo unicelular (CI), con mayor probabilidad de dispersión y favorable relación superficie/volumen, se presente sobre todo en condiciones ambientales donde las posibilidades

reproductivas sean limitadas, debido por ejemplo a estrés por falta de nutrientes, limitación de espacio, falta de luz debido a un efecto sombra por parte de las otras células, entre otros factores (Egan & Trainor, 1989; Shafik, 2000; O'Donnell et al., 2013). Estos fenómenos podrían desencadenar respuestas en los organismos a nivel de cambios morfológicos propios de la plasticidad fenotípica que caracteriza al género (Morales & Trainor, 1997; Lürling, 2003).

La evaluación de la morfología de las células de *Tetrademus* sp. en condiciones normales y de estrés fisiológico permitió observar diferencias significativas entre ambos estados. Según los resultados de las mediciones de individuos en condiciones normales, se puede inferir que las células individuales son en general más anchas y tienen un mayor tamaño del pirenoide que cuando están agrupadas. En cambio, la falta de pirenoide en células estresadas podría indicar que éste se consumió. El pirenoide contribuye al almacenaje de RuBisCO (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxidasa, enzima que cataliza tanto la fijación del CO₂ en carbohidratos así como la fotorrespiración en plantas superiores y algunas algas verdes y rojas), por lo que su ausencia podría dar indicio de una menor actividad fotosintética (Dehning & Tilzer, 1989). Fue notable la menor variabilidad en las dimensiones de las células regulares, sobre todo en el ancho, lo cual podría estar indicando una mayor estabilidad y conservación de los caracteres morfológicos en las células regulares. Estas características observadas confirman la plasticidad fenotípica reportada en este grupo de microalgas (Morales & Trainor, 1997; Lürling, 2003), apreciable en la diversidad de formas que presentaron las células en un cultivo donde no hubo recambio de nutrientes. El hecho de que en cultivos preservados en laboratorio sea muy frecuente observar células individuales por sobre cenobios, ha llevado a numerosos conflictos taxonómicos. Esto sumado a la variabilidad morfológica según las condiciones ambientales da pie a que la caracterización genética de los organismos sea una complementariedad necesaria a la microscopía (Johnson et al., 2007).

La caracterización genética se pudo realizar en base a la información obtenida mediante la secuenciación del fragmento del gen 18S ARNr. La obtención de un 99.7% de coincidencia entre el fragmento secuenciado y una secuencia de *Tetrademus obliquus* CCAP276/3A (Bradley et al., 2016), indica que la cepa aislada podría ser de la especie *Tetrademus obliquus*, aunque no se puede asegurar que se trate de la misma cepa al no haberse observado un 100% de identidad con la secuencia de referencia. Se observó además el mismo porcentaje de similitud entre la secuencia de la cepa aislada y secuencias de los géneros *Scenedesmus* sp. y *Tetrademus* sp. Esto podría explicarse por un lado, al fragmento del gen 18S ARNr utilizado en este trabajo, que podría no conservar la suficiente variabilidad para

diferenciar entre algunas especies de distintos géneros. Otra posible explicación es que existan errores en la asignación taxonómica de las secuencias de referencia, en parte debido a los numerosos cambios en su clasificación taxonómica que han sufrido estos géneros (Wynne & Hallan, 2015; Hegewald & Nobutaka, 2003; Adl et al., 2019; Oliveira et al., 2021).

La primera descripción de lo que actualmente se denomina *Tetradasmus obliquus* fue realizada por Turpin bajo el nombre de *Achnanthes obliqua* en 1828, que la ubicó dentro del grupo de las diatomeas (Bacillariophyceae). Un año después, Meyen describió el género *Scenedesmus*, que incluía todas las algas verdes cocoides autospóricas con cenobios planos o curvos, por lo que el descubrimiento de Turpin quedó contenido en este nuevo género (*Scenedesmus* Meyen). Puntualmente el género *Tetradasmus* como tal, fue descrito por Smith (1913) tomando como tipo a *Tetradasmus wisconsinensis* G. M. Smith, pero el género fue rápidamente incluido dentro de *Scenedesmus* Meyen por Chodat (1913). Fue este mismo autor quien en 1926 propuso numerosos subgéneros para organizar las relaciones taxonómicas dentro de *Scenedesmus* Meyen por Chodat (1926). Posteriormente, estos subgéneros fueron reclasificados a tres: *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Acutodesmus* (Hegewald 1978). Finalmente, en 2015 se propuso la reinserción del género *Tetradasmus* (Wynne & Hallan, 2015) conformado por once taxones de *Acutodesmus*, con la especie tipo *Tetradasmus wisconsinensis*. Este género queda clasificado dentro de la familia Scenedesmaceae, dentro del orden Sphaeropleales. Tanto en la asignación taxonómica como en el árbol filogenético obtenido quedaron en evidencia los conflictos taxonómicos dentro de este grupo. En futuros trabajos en los que se caracterice a cepas aisladas del orden Sphaeropleales, se recomienda el empleo de herramientas genómicas y filogenómicas, ya que son claves para la correcta clasificación de especies de este grupo.

Las PO representan la interacción de la luz con un cultivo en un instante de tiempo en particular. Estas propiedades reflejan la situación entre la luz y todas las variables que existen en ese cultivo: la disposición espacial de las células, agrupaciones, la concentración y disposición de pigmentos y metabolitos, entre otros, en ese instante. Además, se deben tener en cuenta otros factores relacionados al estado de saturación de los fotosistemas y los posibles cambios estructurales que les pueden suceder en el tiempo, como ser la cantidad y tamaño de las antenas, su distancia al resto de la cadena metabólica fotosintética y la disponibilidad de los componentes de dicha cadena (Melis et al., 1996, Melis et al., 1998; Melis, 2009; Niizawa et al., 2014).

Se obtuvo que los coeficientes de dispersión fueron mayores a los de absorción, lo que es de esperar ya que no toda la energía luminosa que se absorbe es luego utilizada como energía química: parte se disipa por fenómenos térmicos y parte por fluorescencia (Pilon et al., 2011).

El estudio de las PO en los cultivos de *Tetradismus* sp. bajo condiciones de luz, concentración de nitrato y temperatura estándares ($168 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, $0.25 \text{ gr}/\text{L}$, 25°C), permitió describir el patrón de crecimiento y fisiología de esta especie bajo dichas condiciones. Este patrón permitiría comparar el comportamiento de esta especie con otras cultivadas en esas condiciones, e incluso será de utilidad para discutir los cambios observados al variar la concentración de nutrientes e intensidad de luz en la misma especie.

En el caso de los coeficientes de absorción intrínsecos en cultivos de *Tetradismus* sp. los valores más bajos de absorción se observaron en el día 8, día que coincide con la máxima cantidad de células y elevado valor de biomasa que tiende a la fase estacionaria observada. En esta fase no es significativamente alta la cantidad de biomasa que se continúa produciendo, y la absorción tampoco es muy elevada, por lo que sería un buen momento para renovar el cultivo si se trata de uno continuo. La disminución en los niveles de absorción intrínsecos a medida que pasa el tiempo, puede responder a la dinámica de los FBR, ya que cuando los niveles de biomasa aumentan se produce un efecto sombra en el interior del FBR (Takache et al., 2012; Niizawa et al., 2014). Por este motivo sólo las células más cercanas a las paredes del recipiente pueden potencialmente absorber parte de la luz suministrada, y cuando aquellas células que por el mezclado pasan hacia la zona iluminada la energía a la que están expuestas es tan elevada que no logran aprovechar la totalidad de ésta debido a que en este estado del cultivo los fotosistemas (en caso de eucariotas), o sus homólogos ficobilisomas en las cianobacterias disminuyen su rendimiento como consecuencia de cambios en las antenas (que aumentan su tamaño) y/o en las clorofilas (que disminuyen su concentración). Esto se ve reflejado en la menor absorción y aprovechamiento de la luz. El hecho de que las cianobacterias presenten ficobiliproteínas accesorias que permiten la captura de luz en un amplio espectro de longitudes de onda, puede justificar las diferencias observadas en los coeficientes de absorción y dispersión entre las cianobacterias *Synechococcus* sp. y *A. maxima* evaluadas y *Tetradismus* sp.

En cuanto a los coeficientes de dispersión obtenidos para *Tetradismus* sp., la baja variabilidad en los valores registrados puede deberse a la presencia de todos los componentes de la suspensión que no tienen valores de absorción particulares (como las paredes, proteínas y otros metabolitos). En los resultados intrínsecos sí es relevante que la dispersión disminuya

en las etapas finales, lo que puede deberse a la mayor biomasa en esos momentos (la luz que no es absorbida por una célula puede refractarse y ser absorbida por otra célula cercana). (Niizawa et al., 2017). El hecho de que al día 0 la dispersión específica sea tan baja, puede deberse a la relación con la también baja biomasa en ese día, que tal vez no llega tener un efecto notable en la dispersión.

En el estudio de contenido de pigmentos fotosintéticos de *Tetradismus* sp. bajo distintas concentraciones de nitrato e intensidad de luz se registraron rangos de valores (Clorofilas totales 772 µg/gr (EXP 13) - 18389 µg/gr (EXP 2); Carotenoides totales: 970 µg/gr (EXP 13) – 4230 µg/gr (EXP 9)), que se encuentran dentro de los reportados en la bibliografía para *Tetradismus obliquus* (Tabla 3, de Oliveira et al., 2021). En particular, la concentración de clorofilas totales mínimas obtenidas fueron algo más bajas de lo reportado, lo que se podría explicar por las diferencias en la calidad de la luz empleada o en la calidad nutricional del medio. Sin embargo, la concentración de clorofilas máximas arrojaron un buen valor considerando que el máximo reportado sólo para las clorofilas a es de 18000 µg/gr . También este es el caso de los carotenoides, en los que se observó un elevado valor mínimo si se compara con el mínimo de luteína reportado, y un elevado valor máximo. Cabe destacar el notable aporte de la luteína por sobre el resto de pigmentos carotenoides en las cifras de referencia.

Tabla 3 - Perfil de concentración de pigmentos para *Tetradismus obliquus* (extraído de Oliveira et al., 2021).

Pigmento	Concentración (µg/gr)	Referencia
Astaxantina	22 – 75 (en peso húmedo)	Mansouri y Hajizadeh (2018)
Clorofila a	800 – 18 000	Maroneze et al. (2019) y Oliveira et al. (2020a)
Clorofila b	895 – 4348	Maroneze et al. (2019) y Singh et al. 2020
Luteína	63 – 3630	Ho et al. (2014) y Maroneze et al. (2019)
Neoxantina	36 – 322	Maroneze et al. (2019)
Violaxantina	2 – 109	Maroneze et al. (2019)
β-Caroteno	7 – 560	Maroneze et al. (2019) y Singh et al. (2020)

Se logró obtener un mapeo de una zona del modelo al cual se ajustan los resultados, que permitiría orientar posteriores ensayos para obtener los valores óptimos de las variables de cultivo. En condiciones de concentración de nitrato similares, el mayor rendimiento en la producción de pigmentos se registró en los experimentos con menor intensidad lumínica. Este resultado demuestra una mayor promoción de la producción de estos metabolitos de la cepa aislada orientada a la mayor eficiencia en la absorción de la escasa luz presente. A su vez, en experiencias sometidas a la misma intensidad de luz, se observó un mayor rendimiento en la producción de pigmentos en condiciones con mayor concentración de nitrato, lo que es lógico en cuanto a la mayor disponibilidad del nutriente para satisfacer la demanda de las vías metabólicas.

En cuanto a los rendimientos de biomasa, se observó que en condiciones de intensidad de luz similares, la productividad disminuye a menor contenido de nitrato, como se observó en las EXP Control y 7 en relación a 13, y en la 9 respecto a 12. Esto es de esperar debido a la importancia de este macronutriente en el medio de cultivo para el desarrollo de la cepa (como se describe en Anexo 1). Sin embargo, en condiciones de baja intensidad lumínica como en las EXP 2 y 8, la biomasa registrada no varió notoriamente pese a la diferencias en la concentración de nitrato. Esto puede deberse a que las células destinaron más energía en la producción de pigmentos para la absorción de luz que para la producción de biomasa. Por otra parte, en condiciones similares de concentración de nitrato, el rendimiento en la producción de biomasa fue mayor en condiciones de mayor intensidad de luz, (por ejemplo EXP Control y 10 respecto a 3, y 9 respecto a 2). Esto indica la importancia de la luz al momento de fijar el carbono para producir biomasa bajo la misma condición nutritiva. (Zhang et al., 2015; Schediwy et al., 2019). Sin embargo, en condiciones de baja concentración de nitrato, esta diferencia no fue tan notoria (por ejemplo EXP 8 y 12); lo que puede ser explicado por la baja concentración de nitrato en esos cultivos, que actuó de manera limitante por sobre el recurso luz (Leonardi et al., 2019). En este caso, una mayor absorción de luz no es posible debido a la falta de clorofilas para que inicien la ruta fotosintética.

En los modelos obtenidos para cada variable, en todos los casos se observa interacción entre las variables, aunque en diferente grado. Es de esperar la significativa contribución del coeficiente lineal de la intensidad de luz en el caso de la producción de carotenoides debido al mecanismo que dispara la expresión de estos pigmentos. Sin embargo, se observó que en los coeficientes cuadráticos la concentración de nitrato aportó más que la intensidad de luz, por lo que pequeñas variaciones en la concentración de nitrato producirían un efecto más significativo que la intensidad de luz en la variable respuesta. Para el caso de los coeficientes obtenidos

para el rendimiento de clorofilas, se puede decir que la concentración de nitrato ejerce una mayor influencia que la luz, aunque leves variaciones en esta última variable considerando el coeficiente cuadrático tendría una influencia notoria en la concentración de clorofila. Por último, al evaluar los coeficientes cuadráticos para el rendimiento de biomasa, se observó que pequeñas variaciones en intensidad de luz podrían producir una influencia notable en la variable de respuesta.

En base a los resultados obtenidos puede decirse que si se desean obtener cultivos con elevado desarrollo tanto de pigmentos como de biomasa, se podrían recomendar condiciones como las de las EXP 9 o 7, aunque si los cultivos se quisieran orientar más bien a la producción de pigmentos, probablemente condiciones como las de la EXP 2 serían adecuadas. Si en cambio la finalidad de la producción del cultivo está dirigida a la producción de biomasa, las condiciones más adecuadas serían las reportadas en la EXP control, 7, 9 o 10. En este último caso, la EXP control sería conveniente en cuanto al uso de recursos, ya que las condiciones implican menor intensidad de luz y menos cantidad de nitrato que las otras EXP. En función a esto es importante tener en cuenta que todas las experiencias fueron realizadas con inóculos de cultivos con células fotoaclimatadas a las condiciones control.

Queda en evidencia entonces que para esta cepa no es posible encontrar una condición que permita obtener máximos valores de biomasa y pigmentos a la vez. Lo mismo sucede para la mayoría de los microorganismos fotosintéticos que se desean emplear con fines industriales (Pfaffinger et al., 2019; Zittelli et al., 2022). Así, los resultados obtenidos sientan las bases para futuros trabajos cuyo objetivo sea la producción industrial de esta cepa, que se podría realizar en dos etapas según las condiciones óptimas halladas: una inicial orientada al desarrollo de biomasa y otra de producción de pigmentos.

Para este proceso de escalado desde laboratorio a industria, las PO pueden ser de utilidad. Se observó que al evaluar los coeficientes intrínsecos de absorción al día final en todas las experiencias con *Tetrademus* sp. existió una similitud esperable entre las EXP 7 y 9 por la semejanza en la tendencia de los resultados obtenidos. Ahora bien, las diferencias detectadas entre los espectros de las EXP 2 y 9, pueden deberse a la intensidad de luz a las que fueron cultivadas (de 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para la EXP 2 y de 256 para la EXP 9). En este sentido, lo que entra en juego son los cambios a nivel estructural de los aparatos fotosintéticos, ya que en ninguno de los dos casos el nitrato fue una condición limitante para la producción de pigmentos. Una posible respuesta puede ser que las células de la EXP2, posean mayor número de antenas, más pequeñas y cercanas a los complejos proteicos que siguen la vía fotosintética, que incrementa su efectividad, lo que tiene sentido si se considera que fueron

cultivadas con baja intensidad de luz. Los resultados de las PO en cuanto a los espectros de absorción específica para la EXP 13 en el tiempo, permiten detectar la región temporal en la que la absorción por parte de las clorofilas disminuye, lo que permite inferir una menor concentración de las mismas y un aumento de carotenoides, entre ellos luteína. En el caso de la comparación de los espectros de absorción específica para las EXP al día final, los resultados entre las EXP 2 y 10 son esperables. La EXP 2, que se mantuvo verde hasta el día 15, absorbió efectivamente más luz con las altas concentraciones de clorofilas que presentó (observadas en el pico a 670 nm), producto de la condición de baja intensidad de luz a la que fue sometido el cultivo. Sin embargo, por más de que en la EXP 2 se obtuvo mayor concentración y rendimiento de carotenoides, la relación clorofilas / carotenoides fue prácticamente 2/1, mientras que para la EXP 10 ambas variables fueron equitativas. Esto tiene sentido desde una perspectiva de mayor síntesis de carotenoides relativos en la EXP 10 para lidiar de una manera más eficiente con los radicales libres cumpliendo su rol de protección. Se observó además que la mayor absorción de luz se dió en cultivos bajo condiciones control de luz y nitrato. Esto es relevante si se considera que el control no obtuvo los máximos de producción ni de rendimientos de biomasa o pigmentos. El hecho de que la absorción sea más efectiva, podría explicarse por la fotoaclimatación a ese estado por parte de las células. Se recuerda que los inóculos para todas las experiencias surgieron de cultivos que fueron desarrollados bajo las condiciones control. Por lo tanto, todos los demás resultados podrían no mostrar una absorción más efectiva debido a que en ningún momento se alcanzó un estado estacionario en cuanto a las adaptaciones fisiológicas que conducen a una real adaptación a las nuevas condiciones. En base a estos resultados, es destacable el uso de las PO como variable de escalamiento de gran utilidad para trasladar cultivos desde niveles de laboratorio a industriales, sobre todo teniendo en cuenta que estas propiedades representan un resumen de todos los factores que se desean mantener constantes independientemente al volumen de los reactores. Adicionalmente, se puede pensar en su futuro empleo como variable de control, de manera tal que la determinación de estas PO se encuentre coordinada con ejecutores que generen cambios en variables como pH, temperatura y/o intensidad de luz que estén direccionados a producir un estado particular en el cultivo.

CONCLUSIÓN

El trabajo realizado permitió cumplir con el objetivo general de esta tesina de diseñar una metodología para desarrollar una colección de cultivos de microorganismos fotosintéticos eucariotas y procariotas. En ese sentido, se desarrolló por primera vez en el INALI (CONICET-UNL) una colección con representantes de 6 géneros de microorganismos fotosintéticos. Cabe destacar que una de las especies, *Tetrademus* sp., es una cepa nativa aislada de un ambiente de la región. La misma fue caracterizada de forma morfológica, genética y fisiológica, y representa un valor adicional el tratarse de una clorofita cuyos representantes son ampliamente utilizados en cultivos con potenciales aplicaciones en distintos campos (como productores de biomasa, bioindicadores, productores de metabolitos de interés comercial, etc.). En el marco de esta tesina, se trabajaron conjuntamente aspectos referidos a las disciplinas de biología y de biotecnología, cuya interpretación y análisis conjunto permiten una mejor comprensión de los aspectos necesarios para el desarrollo de cultivos de especies con potenciales usos biotecnológicos. Se espera que los resultados alcanzados sienten las bases metodológicas para incorporar otras especies a la colección, y que permitan valorar la importancia de contar con especies nativas para su empleo en ensayos y para explorar sus potenciales propiedades y usos.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo artificiales son fórmulas comerciales diseñadas principalmente para proporcionar medios simplificados y definidos, tanto para estudios experimentales como para el mantenimiento rutinario de las cepas. Estos medios se pueden preparar tanto en forma líquida como sólida mediante el uso de agar al 2%. Variables como el pH o el suministro de CO₂ afecta el contenido de nutrientes y la bioquímica del medio. En este sentido, el pH varía con la concentración de CO₂ derivada de la actividad celular propia como la respiración y fotosíntesis: al reaccionar de manera reversible este gas con protones libres produce ácido carbónico.

En cuanto a la composición de los medios, los elementos “esenciales” que deben estar presentes pueden distinguirse en dos grandes grupos según la cantidad en que son requeridos, los macronutrientes y micronutrientes (Fox et al. 2018).

Macronutrientes

-Nitrógeno. El nitrógeno es uno de los principales átomos en la conformación de las estructuras de los organismos fotosintéticos, encontrándose en el cuarto lugar respecto a la abundancia luego de H, C y O; y tercero en cuanto a la masa antecedido por C y O. Este elemento es fundamental ya que se encuentra en los aminoácidos que luego forman proteínas, en nucleótidos transportadores de electrones como ATP o NAD(P)H y en los constituyentes de ácidos nucleicos, así como en la estructura de pigmentos fotosintéticos como clorofilas y ficobilinas. Adicionalmente, la disponibilidad de nitrógeno permite responder a condiciones ambientales adversas, ya que interviene en la producción de osmolitos (glicina, betaína, prolina) en ambientes con elevada osmolaridad, y en la generación del glutatión empleado para combatir las especies reactivas de oxígeno. En cuanto a la asimilación de nitrógeno en microalgas, ésta generalmente se da cuando este átomo se encuentra en forma de iones nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻) y amonio (NH₄⁺). Sin embargo, algunas cianobacterias poseen rutas metabólicas que les permiten fijar nitrógeno molecular atmosférico (N₂), capacidad conocida como diazotrofia. (Raven et al. 2016). Tanto la fuente de nitrógeno como la concentración, afectan la tasa de crecimiento de las microalgas y el contenido lipídico en sus plastos. (Kantas et al. 2015).

-Fósforo. En agua dulce, la relación de N:P es más elevada en comparación a ambientes marinos, por lo que en sistemas ribereños la producción primaria se ve principalmente limitada por la disponibilidad de fósforo. Éste es un nutriente fundamental en cuanto al metabolismo celular, ya que constituye las bases para el almacenamiento de energía en los enlaces de ATP. Las moléculas que forma poseen además una función imperante en lo que respecta a las estructuras: desde fosfolípidos que conforman la membrana celular hasta la formación de enlaces en los ácidos nucleicos. Por lo general, la incorporación de fósforo a los organismos se da en la forma de fosfatos inorgánicos ($[\text{PO}_4]^{-3}$). Sin embargo, estudios recientes revelan que compuestos organofosforados pueden significar una fuente de este nutriente en ambientes acuáticos (Dyhrman et al. 2016).

-Azufre. Participa en la síntesis de aminoácidos sulfurados, membranas, paredes celulares, compuestos tioles como el glutatión que tiene funciones en respuesta al estrés, y la formación de enlaces disulfuro. (Procházková et al. 2014)

-Calcio. Esencial para la transducción de señales y como promotor de respuestas de resistencia frente al estrés (Gorain et al. 2013)

-Magnesio. Los iones de Mg poseen un rol fundamental en la activación de la Acetil-CoA carboxilasa y en la catalización de las primeras etapas de la síntesis de ácidos grasos. (Gorain et al. 2013)

-Cloro y Potasio. Reguladores osmóticos, activadores de sistemas enzimáticos. Cloro estimulador de la fotosíntesis al intervenir en las reacciones de hidrólisis del agua.

Tanto el Nitrógeno y Fósforo como macronutrientes, al igual que muchos otros iones, poseen generalmente una elevada solubilidad en agua y, a excepción del amonio, no presentan altos niveles de toxicidad. No sucede lo mismo en el caso de los micronutrientes, o elementos traza, cuya elevada concentración puede significar alta toxicidad para los organismos. Estos elementos traza son fundamentales para llevar adelante actividades metabólicas vitales, pero a determinadas concentraciones que no comprometan la integridad celular. Es por ello que se los considera nutrientes limitantes que influyen en el desarrollo de los organismos, pero también en el modelado de las comunidades, ya que los requerimientos y niveles de toxicidad para cada elemento difiere entre las especies. Dentro de estos elementos traza se encuentran los metales como los que se destacan a continuación, siguiendo a Sunda et al. (2005) y Quigg (2016).

Micronutrientes

-Hierro. Involucrado en estructuras de enzimas y cofactores, en las cadenas transportadoras de electrones en mitocondrias y cloroplastos, en reacciones de reducción de nitritos y sulfitos, en la fijación de N_2 y en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Un detalle no menor es que muchas veces el hierro puede formar complejos de óxidos que precipitan, lo que disminuye su biodisponibilidad.

-Manganeso. Es esencial para el crecimiento del fitoplancton, ya que está involucrado en la reacción de fotólisis del agua en los fotosistemas II (PSII) para dar inicio a la vía fotosintética (Sauer et al. 2004). Los fotosistemas son complejos multiproteicos, compuestos por los centros de reacción y los complejos de captación de luz (LHC, por sus siglas en inglés) que forman las antenas. Además, el manganeso permite el mantenimiento de la estructura de la membrana de los cloroplastos y forma parte de enzimas de gran importancia, como la superóxido dismutasa que cataliza la eliminación de radicales superóxido.

-Zinc. Constituye el grupo prostético en metaloenzimas como la anhidrasa carbónica, fundamental en el transporte y fijación de CO_2 . El zinc se encuentra también en las denominadas nucleasas con dedos de zinc, involucradas en la regulación de la transcripción de ADN, y en la fosfatasa alcalina, necesaria para obtener fósforo asimilable. Tanto el **Cobalto** como el **Cadmio** en algunos casos, pueden sustituir al zinc en determinadas enzimas, estructuras o procesos como la hidratación o deshidratación de CO_2 .

-Cobre. Elemento fundamental en las citocromo oxidases que conforman la cadena transportadora de electrones respiratoria.

-Molibdeno. Junto con el hierro, este elemento, al encontrarse en las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa, participa en la asimilación de nitrato y la fijación de N_2 en organismos con esta capacidad.

-Níquel. Necesario principalmente en organismos que utilizan urea como fuente de nitrógeno, ya que está presente en la estructura de la enzima ureasa que cataliza justamente la hidrólisis de urea.

-Selenio. Este metaloide forma parte de enzimas glutatión peroxidases, que intervienen en las reacciones con fines antioxidantes.

Tabla 1.1.A - Composición de los medios empleados. Bold's Basal Medium BBM (Sorokina et al., 2020) y BG-11 (Stanier et. al., 1971).

Sustancia	Composición de Medios (gr/L)	
	BBM	BG-11
NaNO ₃	0.250	1.500
CaCl ₂	-	0.003
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.025	-
MgSO ₄	-	0.036
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	-
K ₂ HPO ₄	0.075	0.040
KH ₂ PO ₄	0.175	-
NaCl	0.025	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.010	0.001
H ₃ BO ₃	0.008	-
(NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	-	0.012
Na ₂ CO ₃	-	0.020
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .	-	0.009
Solución de Metales (SM)	1 mL	1 mL
	Composición de la SM (gr/L)	
H ₃ BO ₃ ·2H ₂ O	2.860	8.050
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.810	1.810
ZnSO ₄	0.222	0.222
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	0.049
NaMoO ₄ ·5H ₂ O	0.390	0.390
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	0.079

ANEXO 2

Coefficientes específicos de absorción:

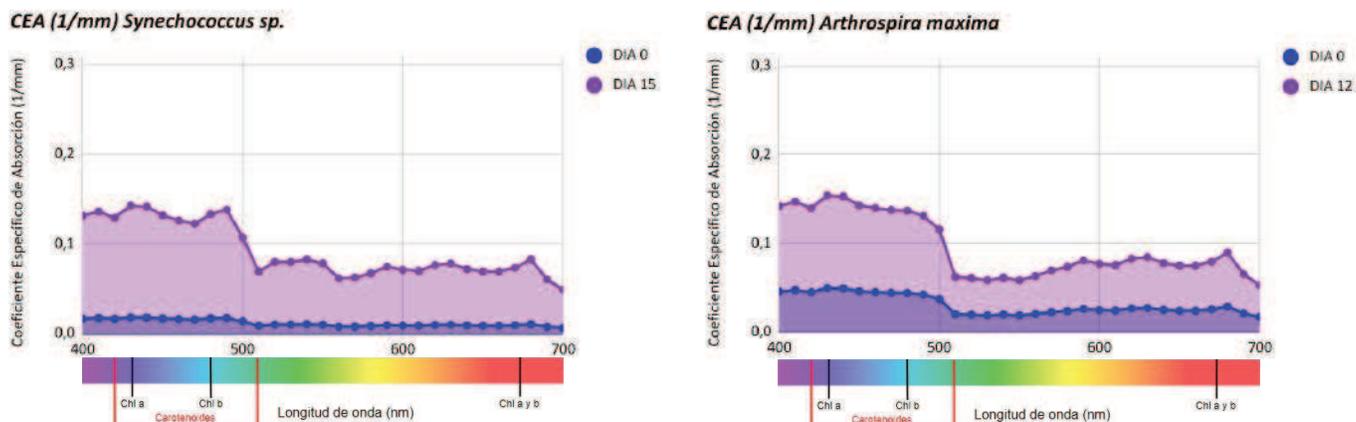


Figura 2.1.A - Coeficientes específicos de absorción para *Synechococcus sp.* y *Arthrospira maxima* al día inicial (azul) y al día final (violeta) de cultivo.

Coefficientes específicos de dispersión:

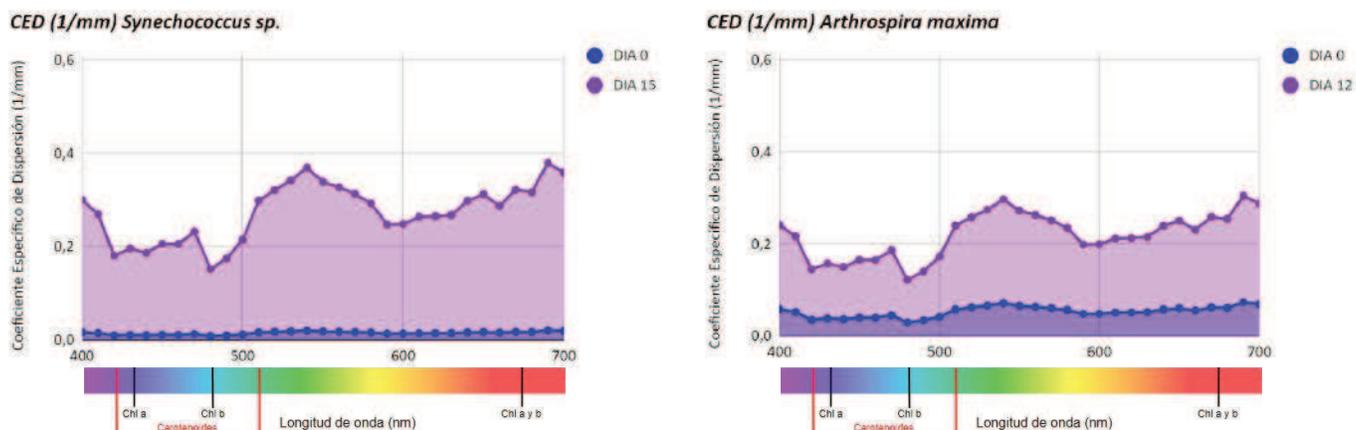


Figura 2.2.A - Coeficientes específicos de dispersión para *Synechococcus sp.* y *Arthrospira maxima* al día inicial (azul) y al día final (violeta) de cultivo.

Al comparar los promedios de los Coeficientes Específicos de Absorción (1/mm) para cada día por especie (Fig. 2.1.A), se observó que la mayor absorción de luz fue por parte de *A. maxima* (0.176 1/mm al día 7), seguida de *Synechococcus sp.* (0.108 1/mm al día 8). Los promedios de absorción generales fueron de 0.102 y 0.07 1/mm para cada especie respectivamente.

A partir de las gráficas puede decirse que las especies de cianobacterias tienen un patrón de absorción similar. El día 0, independientemente de la longitud de onda, no superan en ningún caso los 0.05 (1/mm). Luego a medida que pasa el tiempo, se registran valores crecientes de CEA. En el caso de los Coeficientes Específicos de Dispersión (Fig. 2.2.A), si se comparan los promedios para cada día por especie, se obtiene que la menor dispersión de luz fue por parte de *A. maxima* (0.260 1/mm al día 7), seguida de *Synechococcus* sp. (0.207 1/mm al día 8). En los dos casos puede decirse que es más la luz que se dispersa que la que se absorbe.

ANEXO 3

Tabla 1.3.A - Mix de PCR para volumen final 25 µL

Reactivo	Volumen
Buffer	2,5 µL
MgCl ₂	0,8 µL
dNTPs (10 µM)	2,5 µL
BSA	0,5 µL
Primer 18S F (10 µM)	1 µL
Primer 18S 1200R (10 µM)	1 µL
Taq invitrogen	0,5 µL
Agua	15.2 µL
ADN	1 µL

Tabla 2.3.A - Datos de las secuencias escogidas para la construcción del árbol filogenético

Accession Number	Asignación taxonómica	Clado Asignado	Referencia	Link GenBank
AY510463	<i>Acutodesmus deserticola</i>	Sphaeropleales	Lewis et al. 2004	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY510463
AF008240	<i>Chlamydomonas debaryana</i>	Chlamydomonadales	Buchheim et al., 2007 (in press)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF008240
AY781663	<i>Chlamydomonas globosa</i>	Chlamydomonadales	Buchheim et al. submitted 2004	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY781663
AB511839	<i>Chlamydomonas orbicularis</i>	Chlamydomonadales	Nakada et al. 2010	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB511839
AB511835	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadales	Nakada et al. 2010	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB511835
M32703	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadales	Gunderson et al. 1987	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M32703
U70792	<i>Chlamydomonas zebra</i>	Chlamydomonadales	Buchheim et al. 1997	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U70792
FM205859	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorococcales	Luo et al. 2010	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FM205859
KJ616755	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorococcales	Xi et al. submitted 2014	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ616755
X62441	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorococcales	Huss et al. 1993	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X62441
U70587	<i>Chlorococcum diplobioticum</i>	Chlorococcales	Buchheim et al. 2002	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U70587
JN968585	<i>Chlorococcum minutum</i>	Chlorococcales	Hasikova submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN968585

U70588	<i>Chlorogonium euchlorum</i>	Chlorococcales	Buchheim et al. 2002	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U70588
U70794	<i>Chloromonas perforata</i>	Chlorococcales	Buchheim et al. submitted 1996	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U70794
AB218708	<i>Chlorosphaeropsis alveolata</i>	Chlorococcales	Watanabe et al. unpublished	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB218708
JX316760	<i>Coelastrella saipanensis</i>	Sphaeropleales	Chuck et al. submitted 2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX316760
AB742452	<i>Coelastrella sp KGU-H001</i>	Sphaeropleales	Aburai et al. 2013	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB742452
AB012846	<i>Coelastrella striolata var multistriata</i>	Sphaeropleales	Hanagata submitted 1998	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB012846
JX101327	<i>Desmodesmus communis</i>	Sphaeropleales	Bica et al. 2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX101327
FR865712	<i>Desmodesmus pannonicus</i>	Sphaeropleales	Gachon et al. submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR865712
AB511841	<i>Eudorina unicocca</i>	Chlamydomonadales	Nakada et al. submitted 2009	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB511841
X74002	<i>Halochlorella rubescens</i>	Sphaeropleales	Kessler et al. 1997	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X74002
FR865655	<i>Parachlorella kessleri</i>	Chlorococcales	Gachon et al. submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR865655
X56105	<i>Parachlorella kessleri</i>	Chlorococcales	Huss et al. 1990	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X56105
AF408246	<i>Paulschulzia pseudovolvox</i>	Chlamydomonadales	Karol et al. submitted 2001	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF408246
X63520	<i>Pseudochlorella pringsheimii</i>	Chlorococcales	Huss et al. 1999	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X63520
AB037090	<i>Scenedesmus costatus</i>	Sphaeropleales	Hegewald et al. submitted 2000	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB037090
FR865722	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	Sphaeropleales	Gachon et al. submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR865722
FR865730	<i>Scenedesmus pectinatus</i>	Sphaeropleales	Gachon et al. submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR865730
AB037095	<i>Scenedesmus regularis</i>	Sphaeropleales	Hegewald et al. submitted 2000	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB037095
FR865732	<i>Scenedesmus regularis</i>	Sphaeropleales	Gachon et al. submitted 2011	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR865732
KJ676126	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Sphaeropleales	Rosenberg et al. 2014	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ676126
X56104	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Sphaeropleales	Kessler et al. 1997	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X56104
JN968582	<i>Tetracystis tetraspora</i>	Sphaeropleales	Fulneckova et al. 2012	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN968582
AB037088	<i>Tetradesmus acuminatus</i>	Sphaeropleales	Hegewald et al. submitted 2000	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB037088
LC192133	<i>Tetradesmus acuminatus</i>	Sphaeropleales	Yamaguchi et al. submitted 2016	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC192133
HQ246322	<i>Tetradesmus bajacalifornicus</i>	Sphaeropleales	Hall et al. submitted 2010	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ246322
KJ676128	<i>Tetradesmus dimorphus</i>	Sphaeropleales	Rosenberg et al. 2014	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ676128

KF144164	<i>Tetrademus obliquus</i>	Sphaeropleales	Hodac et al. submitted 2013	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF144164
KX427161	<i>Tetrademus obliquus</i>	Sphaeropleales	Thiyam et al. submitted 2016	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX427161
MG971386	<i>Tetrademus obliquus ABC009</i>	Sphaeropleales	Koh et al. submitted 2018	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG971386
KU900221	<i>Tetrademus obliquus CCAP2763A</i>	Sphaeropleales	Bradley et al. 2016	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU900221
AJ249515	<i>Tetrademus obliquus UTEX1450</i>	Sphaeropleales	van Hannen et al. submitted 1999	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ249515
MH683871	<i>Tetrademus sp YACCYB362</i>	Sphaeropleales	Wubulikasimu et al. submitted 2018	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH683871

ANEXO 4

Calibración del equipo de determinación de propiedades ópticas

Calibración:

En la Fig. (4.1.A) se grafican los valores obtenidos de la calibración. Se muestra la intensidad espectral de la luz de la fuente (relativa al espectrómetro) con respecto a las longitudes de onda de todo el espectro visible (400-700 nm). Se destaca que los valores de Intensidad se alteran al colocar la cubeta vacía, y que cuando se interpone la cubeta con agua destilada, esta última ejerce un efecto denominado concentrador. Dicho efecto produce que los rayos de luz se dispersen menos de lo que lo hacen en aire, por lo que los valores de intensidad relativa con agua destilada son mayores a los de la cubeta con aire, aunque menores a los registrados en ausencia de cubeta.

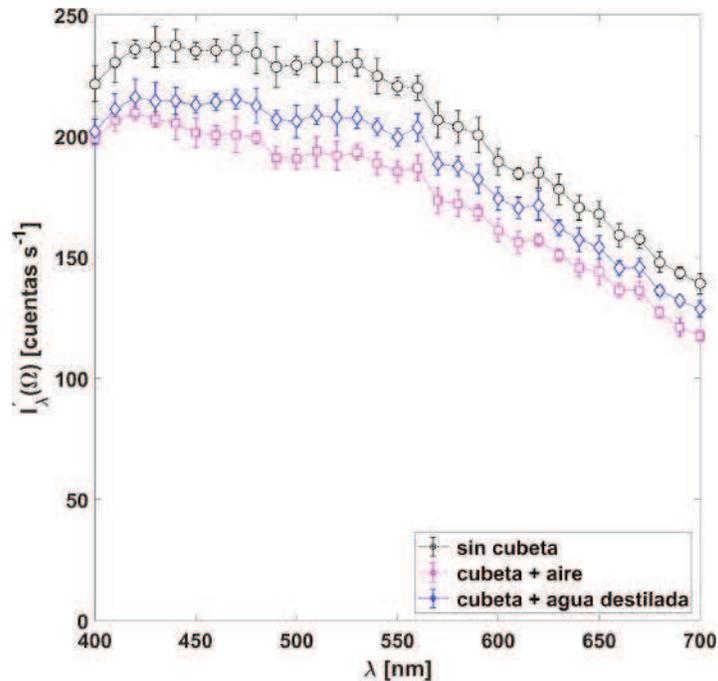


Figura 4.1.A - Valores de intensidad relativos al espectrómetro respecto a la longitud de onda

Etapas 2:

En (4.2.A) se observa una función que mejor representa la intensidad de luz registrada por el receptor, según el ángulo con que el haz de luz incide en el mismo luego de atravesar una muestra de cultivo de *Tetrademus* sp. Esta caracterización direccional de la luz muestra que en ángulo 0, es decir sin movimiento del brazo mecánico, la intensidad es máxima. A ese valor de Intensidad se relativizan el resto de Intensidades obtenidas. Se observa que los valores de Intensidad disminuyen a una tasa considerable a medida que se aumenta el ángulo

de incidencia al receptor del brazo mecánico, tendiendo a la asíntota 0 a partir del ángulo crítico de 17°. Cabe destacar que la gráfica obtenida refleja los datos obtenidos cuando el brazo mecánico fue movido desde el 0 en una dirección. Al existir simetría, los datos obtenidos para una dirección deberían corresponderse con los registrados al mover el brazo mecánico hacia la dirección contraria respecto del ángulo 0.

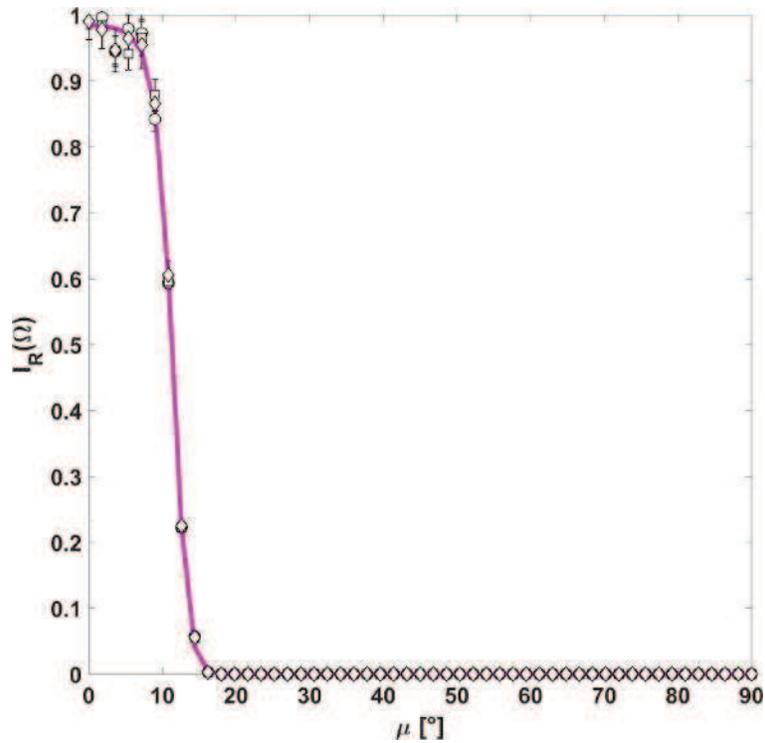


Figura 4.2.A - Variación de la Intensidad de luz relativa respecto al ángulo de incidencia al receptor

Coefficientes intrínsecos de Absorción:

Tabla 1.4.A - Coeficientes intrínsecos de absorción promedio de suspensiones de *Tetrademus* sp. (BBM, 168 μ moles de luz y 25°C) para 4 instantes de tiempo.

Longitud de onda (nm)	DIA 0		DIA 3		DIA 8		DIA 15	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
400	0.19800	0.00787	0.22693	0.00461	0.04933	0.00084	0.08800	0.00147
410	0.22077	0.00580	0.25570	0.00518	0.05739	0.00215	0.09949	0.00200
420	0.18880	0.00362	0.20109	0.00780	0.04480	0.00095	0.08616	0.00165
430	0.24554	0.00497	0.28691	0.00631	0.06336	0.00129	0.11449	0.00490
440	0.23001	0.00219	0.26254	0.00252	0.05718	0.00142	0.10678	0.00280
450	0.17468	0.00577	0.18831	0.00702	0.04126	0.00175	0.07954	0.00267
460	0.16592	0.00195	0.18028	0.00524	0.04017	0.00047	0.07493	0.00165
470	0.17323	0.00085	0.19728	0.00300	0.04253	0.00082	0.08011	0.00233
480	0.18949	0.00449	0.22518	0.00708	0.04855	0.00122	0.08590	0.00191
490	0.16598	0.00377	0.19463	0.00472	0.04296	0.00099	0.07740	0.00355
500	0.11023	0.00220	0.11759	0.00352	0.02635	0.00052	0.05036	0.00113
510	0.07002	0.00184	0.08341	0.00312	0.01801	0.00042	0.03233	0.00140
520	0.02494	0.00074	0.02957	0.00111	0.00651	0.00030	0.01113	0.00032
530	0.01607	0.00040	0.01864	0.00048	0.00404	0.00005	0.00754	0.00022
540	0.01380	0.00020	0.01628	0.00050	0.00352	0.00004	0.00626	0.00010
550	0.00527	0.00015	0.00558	0.00011	0.00124	0.00005	0.00238	0.00004
560	0.00353	0.00007	0.00389	0.00001	0.00085	0.00005	0.00159	0.00001
570	0.01272	0.00028	0.01490	0.00035	0.00327	0.00006	0.00569	0.00015
580	0.01837	0.00026	0.02160	0.00060	0.00478	0.00020	0.00840	0.00017
590	0.02656	0.00075	0.03092	0.00069	0.00682	0.00013	0.01215	0.00041
600	0.03089	0.00099	0.03506	0.00070	0.00773	0.00015	0.01401	0.00036
610	0.03717	0.00156	0.04066	0.00097	0.00875	0.00045	0.01709	0.00053
620	0.04469	0.00117	0.05104	0.00125	0.01128	0.00022	0.02020	0.00036
630	0.04861	0.00132	0.05774	0.00121	0.01282	0.00037	0.02285	0.00095
640	0.07158	0.00068	0.08304	0.00208	0.01799	0.00018	0.03211	0.00083
650	0.09255	0.00178	0.10780	0.00332	0.02307	0.00051	0.04202	0.00062
660	0.10167	0.00226	0.11874	0.00143	0.02610	0.00030	0.04643	0.00091
670	0.13941	0.00339	0.15514	0.00410	0.03444	0.00035	0.06421	0.00043
680	0.14737	0.00251	0.17260	0.00452	0.03746	0.00032	0.06726	0.00099
690	0.07205	0.00163	0.07975	0.00166	0.01737	0.00030	0.03315	0.00057
700	0.01819	0.00040	0.02053	0.00034	0.00456	0.00006	0.00812	0.00014

Coefficientes específicos de Absorción

Tabla 2.4.A - Coeficientes específicos de absorción promedio de suspensiones de *Tetrademus* sp. (BBM, 168 μ moles de luz y 25°C) para 4 instantes de tiempo.

Longitud de onda (nm)	DIA 0		DIA 3		DIA 8		DIA 15	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
400	0.00629	0.00114	0.08598	0.01183	0.07348	0.00759	0.24619	0.019
410	0.00701	0.00117	0.09679	0.01211	0.08567	0.01181	0.27846	0.02243
420	0.00597	0.00079	0.07584	0.0061	0.06662	0.00558	0.24136	0.02402
430	0.00778	0.00118	0.10856	0.01317	0.09442	0.01044	0.32098	0.0384
440	0.00728	0.00102	0.09929	0.01147	0.08503	0.00717	0.29939	0.03311
450	0.00551	0.00061	0.07104	0.00586	0.06126	0.00356	0.22263	0.01818
460	0.00525	0.00071	0.06805	0.00611	0.0598	0.00557	0.20972	0.01687
470	0.00549	0.00081	0.07473	0.01003	0.06328	0.00542	0.2246	0.02593
480	0.00601	0.00096	0.08539	0.01269	0.07227	0.00745	0.24025	0.01903
490	0.00526	0.00082	0.07365	0.00903	0.06401	0.00711	0.21703	0.02651
500	0.00349	0.0005	0.04439	0.00399	0.03925	0.00405	0.14121	0.01555
510	0.00222	0.00037	0.03164	0.00493	0.02686	0.00304	0.0907	0.01075
520	0.00079	0.00013	0.01123	0.00175	0.00974	0.00137	0.03114	0.00203
530	0.00051	0.00006	0.00706	0.00102	0.00605	0.00067	0.02116	0.0024
540	0.00044	0.00007	0.00617	0.00093	0.00525	0.00058	0.01747	0.00127
550	0.00017	0.00003	0.00212	0.00022	0.00183	0.00014	0.00663	0.00065
560	0.00011	0.00002	0.00147	0.00017	0.00127	0.00011	0.00449	0.00046
570	0.0004	0.00007	0.00565	0.00079	0.0049	0.00061	0.01597	0.00113
580	0.00058	0.00009	0.00818	0.0012	0.00713	0.00098	0.0236	0.00226
590	0.00084	0.00014	0.01169	0.00147	0.01016	0.00115	0.03401	0.00356
600	0.00098	0.00017	0.01329	0.00185	0.01151	0.0014	0.03927	0.00425
610	0.00117	0.00012	0.01536	0.00166	0.01299	0.00069	0.0478	0.00419
620	0.00142	0.00024	0.01929	0.00217	0.01679	0.00172	0.05649	0.00486
630	0.00154	0.00022	0.02186	0.00283	0.01913	0.00243	0.06399	0.00747
640	0.00227	0.00034	0.03148	0.00455	0.02682	0.00281	0.08973	0.00574
650	0.00294	0.00047	0.04088	0.00613	0.03434	0.00317	0.11768	0.01086
660	0.00322	0.00043	0.04495	0.00566	0.03883	0.00411	0.1298	0.00904
670	0.0044	0.00053	0.05857	0.00546	0.05125	0.00463	0.17982	0.01584
680	0.00466	0.00062	0.06542	0.00951	0.05581	0.00597	0.18814	0.01399
690	0.00228	0.00028	0.03018	0.0038	0.02587	0.00238	0.0929	0.00925
700	0.00058	0.00009	0.00775	0.00087	0.00677	0.00072	0.0227	0.0016

Coefficientes intrínsecos de dispersión:

Tabla 3.4.A - Coeficientes intrínsecos de dispersión promedio de suspensiones de *Tetrademus* sp. (BBM, 168 μ moles de luz y 25°C) para 4 instantes de tiempo.

Longitud de onda (nm)	DIA 0		DIA 3		DIA 8		DIA 15	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
400	0.73334	0.02306	0.76313	0.02268	0.21465	0.00765	0.11096	0.00404
410	0.78820	0.01555	0.83289	0.00949	0.23385	0.00358	0.11866	0.00132
420	0.70150	0.01845	0.72208	0.01742	0.20549	0.00489	0.10484	0.00291
430	0.68701	0.01886	0.71984	0.01852	0.20621	0.00454	0.10382	0.00353
440	0.84028	0.01846	0.93428	0.01582	0.26198	0.00662	0.12651	0.00202
450	0.84027	0.02753	0.92493	0.01642	0.26253	0.00629	0.12571	0.00140
460	0.76335	0.01632	0.80675	0.00764	0.22897	0.00238	0.11310	0.00288
470	0.88694	0.02061	1.03787	0.04616	0.28983	0.00820	0.13532	0.00299
480	0.73314	0.01752	0.76549	0.01973	0.21379	0.00558	0.11006	0.00336
490	0.84171	0.01444	0.90890	0.02089	0.25926	0.00196	0.13047	0.00239
500	0.86149	0.01486	0.94900	0.02203	0.26606	0.00277	0.12977	0.00412
510	0.98392	0.01384	1.12082	0.04258	0.31121	0.00438	0.14775	0.00294
520	1.02404	0.02694	1.14228	0.02119	0.32309	0.00627	0.15527	0.00373
530	0.88877	0.01741	0.92880	0.03121	0.26935	0.00589	0.13434	0.00349
540	0.95327	0.00259	1.03615	0.00077	0.29397	0.00176	0.14294	0.00289
550	0.92228	0.01135	1.00976	0.00576	0.27967	0.00858	0.14186	0.00139
560	0.99262	0.03170	1.07743	0.00794	0.30945	0.00848	0.14938	0.00251
570	0.98511	0.03208	1.08948	0.02469	0.30824	0.00743	0.14833	0.00275
580	0.93457	0.01555	1.06185	0.02266	0.29573	0.00447	0.14578	0.00534
590	0.85522	0.01978	0.90822	0.01649	0.25191	0.00550	0.12815	0.00155
600	0.95530	0.03085	1.05771	0.03028	0.29689	0.00530	0.14133	0.00239
610	0.91711	0.02315	0.99265	0.01659	0.28265	0.00225	0.13908	0.00315
620	0.79922	0.03193	0.85384	0.01748	0.24470	0.00524	0.12490	0.00272
630	0.78549	0.01711	0.82103	0.02033	0.22888	0.01007	0.11952	0.00246
640	0.81582	0.01716	0.90220	0.00390	0.25785	0.00602	0.12371	0.00295
650	0.94918	0.03574	1.06165	0.02404	0.30640	0.01217	0.14078	0.00352
660	0.80011	0.01309	0.86215	0.02020	0.23852	0.00405	0.11999	0.00135
670	0.83016	0.01711	0.89430	0.01396	0.25772	0.00487	0.12439	0.00068
680	0.78689	0.01508	0.82165	0.01564	0.23050	0.00680	0.11915	0.00190
690	0.95144	0.01318	1.08129	0.02817	0.30421	0.00593	0.14498	0.00182
700	0.88035	0.01097	0.92214	0.02559	0.26173	0.00558	0.13192	0.00340

Coefficientes específicos de dispersión:

Tabla 4.4.A - Coeficientes específicos de dispersión promedio de suspensiones de *Tetrademus* sp. (BBM, 168 μ moles de luz y 25°C) para 4 instantes de tiempo.

Longitud de onda (nm)	DIA 0		DIA 3		DIA 8		DIA 15	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
400	0.02316	0.00264	0.28812	0.02722	0.31887	0.02140	0.31052	0.02615
410	0.02498	0.00380	0.31501	0.03675	0.34786	0.03018	0.33237	0.03172
420	0.02221	0.00322	0.27284	0.02886	0.30581	0.02999	0.29352	0.02658
430	0.02170	0.00255	0.27184	0.02652	0.30696	0.03107	0.29049	0.02367
440	0.02666	0.00434	0.35352	0.04285	0.38989	0.03647	0.35408	0.02942
450	0.02669	0.00464	0.35041	0.04791	0.39149	0.04878	0.35198	0.03174
460	0.02420	0.00377	0.30507	0.03470	0.34094	0.03466	0.31642	0.02384
470	0.02810	0.00417	0.39405	0.06442	0.43229	0.05480	0.37864	0.03095
480	0.02319	0.00312	0.28959	0.03540	0.31788	0.02607	0.30805	0.02743
490	0.02661	0.00337	0.34327	0.03336	0.38585	0.03600	0.36573	0.03915
500	0.02724	0.00343	0.35954	0.04988	0.39632	0.04213	0.36278	0.02465
510	0.03119	0.00478	0.42532	0.06695	0.46373	0.05168	0.41314	0.02891
520	0.03251	0.00546	0.43274	0.05871	0.48170	0.05716	0.43506	0.04445
530	0.02810	0.00352	0.35046	0.02995	0.40125	0.04400	0.37588	0.03096
540	0.03019	0.00436	0.39199	0.04644	0.43786	0.04635	0.39980	0.02902
550	0.02917	0.00382	0.38212	0.04696	0.41564	0.03057	0.39737	0.03928
560	0.03152	0.00545	0.40770	0.04938	0.46161	0.05897	0.41848	0.04200
570	0.03129	0.00544	0.41293	0.05858	0.45970	0.05735	0.41546	0.04149
580	0.02959	0.00415	0.40240	0.05635	0.44029	0.04401	0.40875	0.04827
590	0.02711	0.00423	0.34383	0.04443	0.37456	0.02965	0.35884	0.03301
600	0.03034	0.00526	0.40106	0.05933	0.44264	0.05244	0.39536	0.02864
610	0.02911	0.00485	0.37526	0.04101	0.42095	0.04322	0.38979	0.04141
620	0.02521	0.00262	0.32259	0.03314	0.36446	0.03905	0.35016	0.03827
630	0.02483	0.00311	0.31007	0.03040	0.33983	0.01935	0.33472	0.03155
640	0.02579	0.00323	0.34144	0.04207	0.38449	0.04704	0.34604	0.02404
650	0.03017	0.00539	0.40190	0.05107	0.45741	0.06397	0.39366	0.02777
660	0.02535	0.00384	0.32661	0.04499	0.35474	0.02967	0.33594	0.02912
670	0.02634	0.00426	0.33804	0.03632	0.38420	0.04581	0.34821	0.02937
680	0.02493	0.00370	0.31043	0.03166	0.34254	0.02440	0.33392	0.03431
690	0.03013	0.00433	0.40994	0.05953	0.45356	0.05423	0.40582	0.03401
700	0.02786	0.00385	0.34810	0.03178	0.38917	0.03099	0.36908	0.02899

ANEXO 5

Tabla 1.5.A - Cantidad de biomasa y concentración de carotenoides totales (Car tot) y clorofilas totales (Chl tot) registradas para el día final 15 por experiencia con *Tetradismus* sp.

Experiencia	Biomasa al día final (mg/mL)	Pigmentos (µg/mL)		Pigmentos (µg/gr)	
		Car Tot al día final (µg/mL)	Chl Tot al día final (µg/mL)	Car tot al día final (µg/gr)	Chl tot al día final (µg/gr)
Control	2.68	5.75	9.88	2143	3681
EXP 2	1.39	11.59	25.51	8358	18389
EXP 3	1.13	5.84	12.54	5171	11099
EXP 8	1.18	1.82	2.70	1550	2300
EXP 9	3.13	13.24	25.45	4231	8132
EXP 10	2.63	7.26	7.59	2760	2888
EXP 12	1.10	1.57	2.17	1428	1974
EXP 7	2.62	10.19	22.70	3889	8664
EXP 13	1.48	1.43	1.14	970	772

Tabla 2.5.A - Rendimientos (R) de biomasa y de concentración de carotenoides (R. CAR) y de clorofilas (R. CHL) por experiencia.

Experiencia N°	Concentración de Nitrato (g/L)	Cantidad de Luz (umol/m ² s)	R. Biomasa (mg/mL/día)	R. CAR (µg car/ mg biom / día)	R. CHL (µg chl / mg biom / día)
Control	0.25	168	0.178	2.085	3.600
EXP 2	0.381	80	0.089	8.577	18.846
EXP 3	0.250	44	0.075	5.046	10.795
EXP 8	0.119	80	0.076	1.451	2.034
EXP 9	0.381	256	0.205	4.292	8.248
EXP 10	0.250	292	0.173	2.695	2.737
EXP 12	0.119	256	0.071	1.143	1.471
EXP 7	0.435	168	0.171	3.925	8.733
EXP 13	0.065	168	0.096	0.837	0.525

A continuación se exponen la verificación de los supuestos y algunas de las salidas del programa Design Expert para cada variable respuesta analizada (rendimiento de carotenoides totales, rendimiento de clorofilas totales y rendimiento de biomasa). Para cada una además se muestran 5 tablas, a saber:

A- Contribución del modelo y de los residuos al Cor Total (Corrected Total Sum of Squares).

B- Ajuste de los datos al modelo propuesto por el programa

C- Tabla de coeficientes estimados para la obtención del modelo en base a la normalización de las variables independientes (en este caso, contenido de nitrato e intensidad de luz). Como cada variable posee una determinada unidad y orden de magnitud, el programa realiza una normalización de dichas variables para generar el modelo, con el fin de aumentar la potencia predictiva del mismo.

D- Polinomio del modelo obtenido en base a las variables normalizadas.

E- Polinomio del modelo transformado matemáticamente a las condiciones originales de las variables. Esta es la función que se encuentra graficada en los resultados correspondientes.

En todos los casos se han cumplido los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos para el modelo. En el caso de carotenoides totales y de clorofilas totales el test de Cook sugirió eliminar dos datos, pero se decidió no hacerlo en base al cumplimiento de los otros supuestos y a la no elevada cantidad de experiencias.

En todos los casos para las tablas A el modelo presentó significativamente más peso que los residuos al Cor Total, y el coeficiente "lack of fit" fue siempre no significativo, lo que indica un mayor soporte a los modelos. Además, el valor de R^2 en todas las tablas B fue elevado, lo que indica buen ajuste de los datos. Se destaca que para evaluar la contribución de cada variable explicativa al modelo, se calculó el porcentaje de aporte de cada variable explicativa (A, B, AB, A2 y B2), tomando como total la sumatoria de la suma de cuadrados de cada una de ellas. Esto se incorporó a la tabla de salida del programa en la columna "% aporte".

Rendimiento de Carotenoides Totales

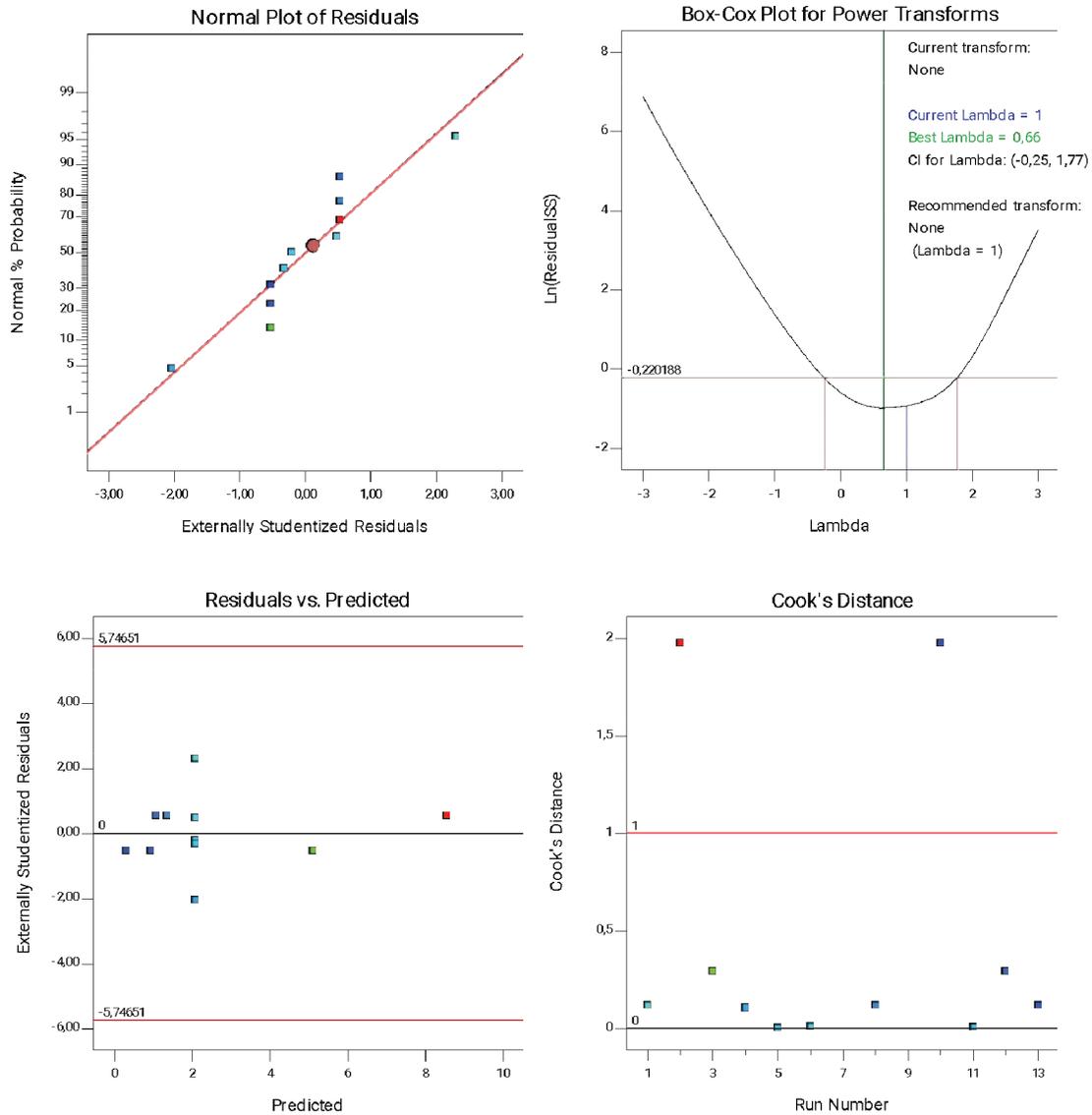


Figura 5.1.A - Verificación de supuestos - Rendimiento de carotenoides totales

TABLA A - Car Tot

Source	Sum of Squares	% aporte	F-value	p-value
Model	54,93		138,86	< 0.0001
A-Luz	11,92	52.5%	150,68	< 0.0001
B-Concentración de Nitrato	5,52	24.3%	69,75	0,0004
AB	3,38	14.88%	42,66	0,0013
A ²	0,6132	2.7%	7,75	0,0387
B ²	1,27	5.59%	16,00	0,0103
Residual	0,3956			
Lack of Fit	0,0261		0,2820	0,6235
Pure Error	0,3695			
Cor Total	55,33			

TABLA B - Car tot

Std. Dev.	0,2813
Mean	2,52
C.V. %	11,15
R²	0,9929
Adjusted R²	0,9857
Predicted R²	0,9458
Adeq Precision	39,7415

TABLA C - Car Tot

Factor	Coefficient Estimate	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	2,09	0,1258	1,76	2,41
A-Luz	-0,9305	0,0758	-1,13	-0,7357
B-Concentración de Nitrato	0,7786	0,0932	0,5389	1,02
AB	-0,3270	0,0501	-0,4556	-0,1983
A ²	0,0921	0,0331	0,0071	0,1772
B ²	0,1259	0,0315	0,0450	0,2068

TABLA D - Car Tot

Rendimiento aparente CAR	=
+2,09	
-0,9305	A
+0,7786	B
-0,3270	AB
+0,0921	A ²
+0,1259	B ²

TABLA E - Car Tot

Rendimiento aparente CAR	=
+0,004392	
+0,001233	Luz
+13,27400	Concentración de Nitrato
-0,136230	Luz * Concentración de Nitrato
+0,000040	Luz ²
+50,36866	Concentración de Nitrato ²

Figura 5.2.A - Set de Tablas con salidas de Design Expert para el rendimiento de Carotenoides Totales en *Tetrademus* sp.

Rendimiento de Clorofilas Totales

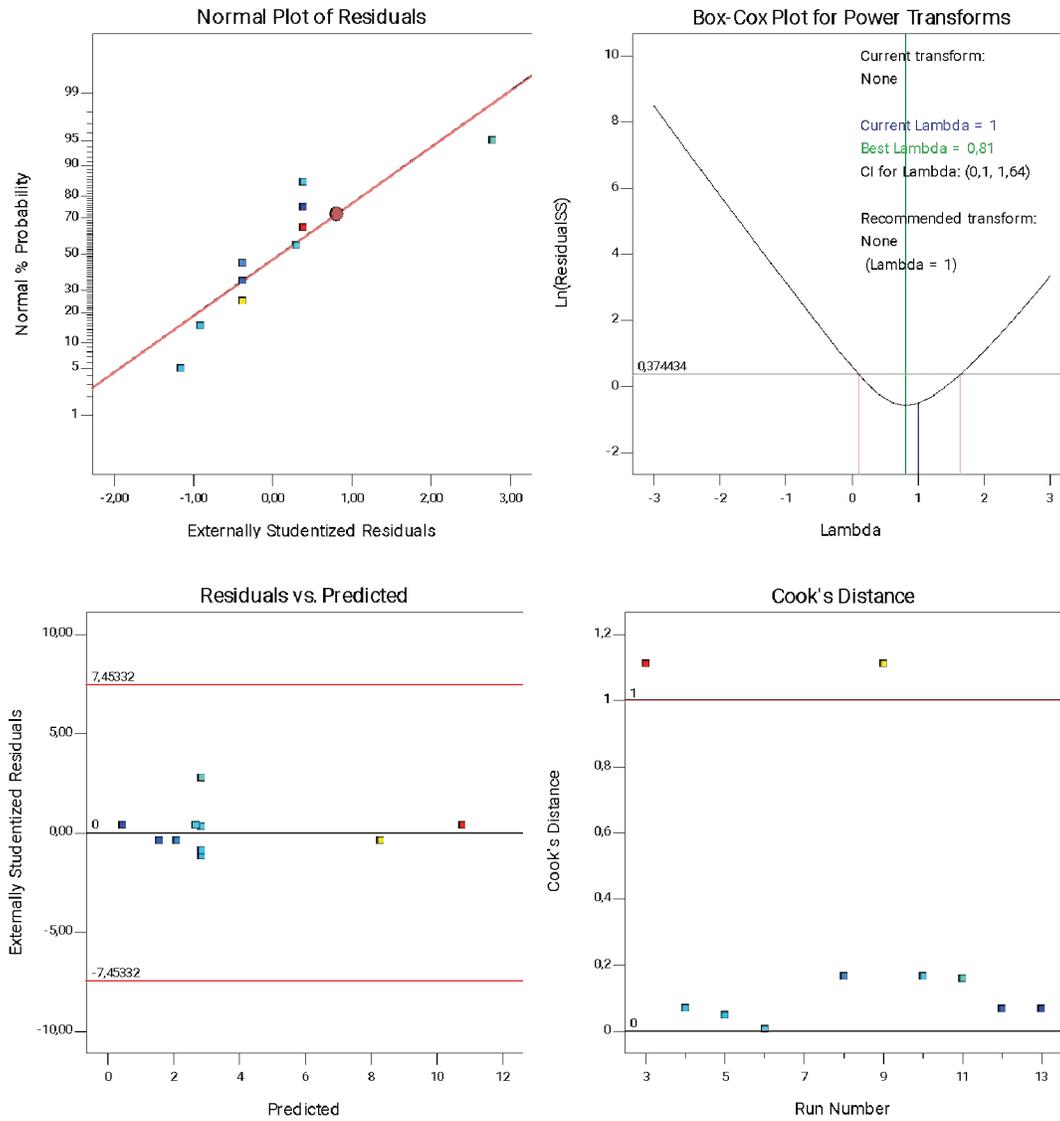


Figura 5.3.A - Verificación de supuestos - Rendimiento de clorofilas totales

TABLA A - Chi Tot

Source	Sum of Squares	% aporte	F-value	p-value
Model	92,62		124,10	0,0002
A-Luz	33,70	26.39%	225,75	0,0001
B-Concentración de Nitrato	47,29	37.03%	316,79	< 0.0001
AB	9,32	7.29%	62,42	0,0014
A ²	22,27	17.44%	149,17	0,0003
B ²	15,10	11.852%	101,18	0,0005
Residual	0,5971			
Lack of Fit	0,0277		0,1458	0,7280
Pure Error	0,5694			
Cor Total	93,21			

TABLA B - Chi Tot

Std. Dev.	0,3864
Mean	3,72
C.V. %	10,38
R²	0,9936
Adjusted R²	0,9856
Predicted R²	0,9615
Adeq Precision	34,5408

TABLA C - Chi Tot

Factor	Coefficient Estimate	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	2,85	0,1932	2,32	3,39
A-Luz	-1,56	0,1041	-1,85	-1,28
B-Concentración de Nitrato	2,28	0,1281	1,92	2,63
AB	-0,5432	0,0688	-0,7341	-0,3523
A ²	0,5772	0,0473	0,4460	0,7084
B ²	0,4396	0,0437	0,3182	0,5609

TABLA D - Chi Tot

Rendimiento aparente CHL	=
+2,85	
-1,56	A
+2,28	B
-0,5432	AB
+0,5772	A ²
+0,4396	B ²

TABLA E - Chi Tot

Rendimiento aparente CHL	=
+5,48754	
-0,060185	Luz
-4,30833	Concentración de Nitrato
-0,226341	Luz * Concentración de Nitrato
+0,000251	Luz ²
+175,83291	Concentración de Nitrato ²

Figura 5.4.A - Set de Tablas con salidas de Design Expert para el rendimiento de Clorofilas Totales en *Tetrademus* sp.

Rendimiento de Biomasa

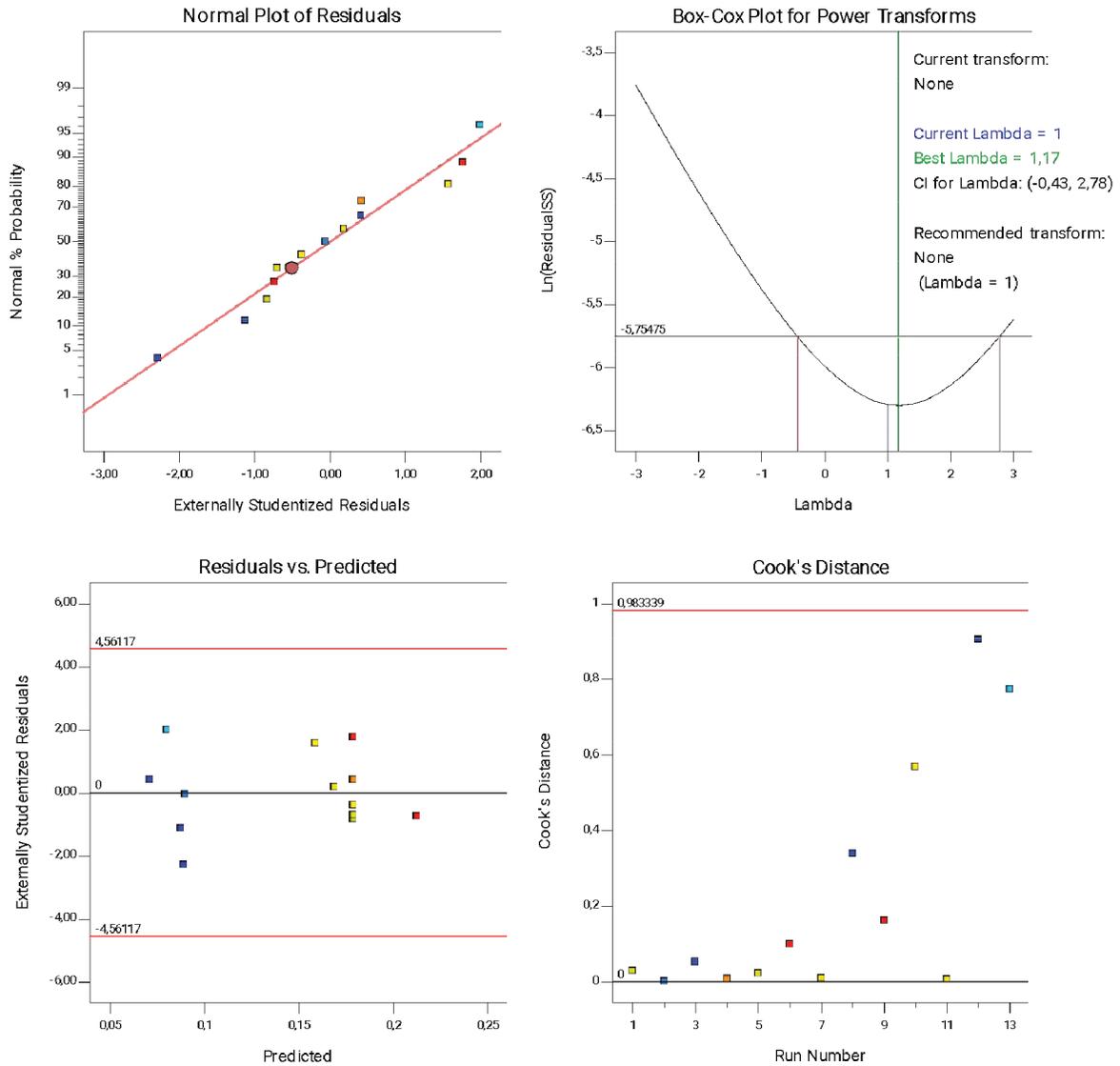


Figura 5.5.A - Verificación de supuestos - Rendimiento de biomasa

TABLA A - Biomasa

Source	Sum of Squares	% aporte	F-value	p-value
Model	0,0301		22,89	0,0003
A-Luz	0,0077	24.44%	29,23	0,0010
B-Concentración de Nitrato	0,0079	25.07%	30,07	0,0009
AB	0,0037	11.74%	14,01	0,0072
A ²	0,0071	22.53%	26,97	0,0013
B ²	0,0051	16.19%	19,46	0,0031
Residual	0,0018			
Lack of Fit	0,0010		1,58	0,3261
Pure Error	0,0008			
Cor Total	0,0320			

TABLA B - Biomasa

Std. Dev.	0,0162
Mean	0,1421
C.V. %	11,42
R ²	0,9424
Adjusted R ²	0,9012
Predicted R ²	0,7365
Adeq Precision	12,8378

TABLA C - Biomasa

Factor	Coefficient Estimate	Standard Error	95% CI Low	95% CI High
Intercept	0,1785	0,0073	0,1613	0,1957
A-Luz	0,0169	0,0031	0,0095	0,0244
B-Concentración de Nitrato	0,0120	0,0022	0,0069	0,0172
AB	0,0064	0,0017	0,0023	0,0104
A ²	-0,0095	0,0018	-0,0139	-0,0052
B ²	-0,0040	0,0009	-0,0061	-0,0018

TABLA D - Biomasa

Productividad de biomasa	=
+0,1785	
+0,0169	A
+0,0120	B
+0,0064	AB
-0,0095	A ²
-0,0040	B ²

TABLA E - Biomasa

Productividad de biomasa	=
-0,046246	
+0,001082	Luz
+0,592268	Concentración de Nitrato
+0,002648	Luz * Concentración de Nitrato
-4,14114E-06	Luz ²
-1,59241	Concentración de Nitrato ²

Figura 5.6.A - Set de Tablas con salidas de Design Expert para el rendimiento de Biomasa en *Tetrademus sp.*

BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... & Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119. doi:10.1111/jeu.12691
- Alben, K. T. (2002). Books and software: design, analyze, and optimize with Design-expert. *Analytical Chemistry*. 222-A. doi: 10.1021/ac0219703.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andersen, R.A. (2005). *Algal Culture Techniques*. Elsevier Inc.
- Bicudo, C.E. & Menezes, M. (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. Editora Rima, Brasil.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., & Prinsep, M. R. (2016). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 33, 382-431. doi: 10.1039/c6np00124f
- Cadoret, J.-P., Garnier, M., & Saint-Jean, B. (2012). Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. *Genomic Insights into the Biology of Algae*. 285–341. doi:10.1016/b978-0-12-391499-6.00008-6.
- Chen, Q., Li, Y., & Li, B. (2020). Is color a matter of concern during microplastic exposure to *Scenedesmus obliquus* and *Daphnia magna*?. *Journal of hazardous materials*, 383, 121224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121224>
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5-11. doi: 10.1002/jsfa.5902
- Del Campo, J.A., García-González, M. & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production : current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74. 1163-1174. doi: 10.1007/s00253-007-0844-9
- Devercelli, M., Zalocar de Domitrovic Y., Forastier, M. & Meichtry de Zaburlín, N. (2014). Phytoplankton of the Paraná River Basin. In: Tell, G., Izaguirre, I. & O'Farrell, I. Freshwater phytoplankton from Argentina. *Fundamental and Applied Limnology*. 10.1016/j.procbio.2008.01.004 Special Issue: *Advances in Limnology* (65), 39-65. Doi: 10.1127/1612-166X/2014/0065-0033
- Dehning, I., & Tilzer, M. M. (1989). Survival of *Scenedesmus acuminatus* (chlorophyceae) in darkness. *Journal of Phycology*, 25(3), 509-515. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00256.x>
- Di Caprio, F., Pagnanelli, F., Wijffels, R. H., & Van der Veen, D. (2018). Quantification of *Tetradesmus obliquus* (Chlorophyceae) cell size and lipid content heterogeneity at single-cell level. *Journal of Phycology*, 54(2), 187-197. doi: <https://doi.org/10.1111/jpy.12610>
- Dyhrman, S. T., Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). *The physiology of microalgae*. *Physiol Microalgae*. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_8
- Egan, P. F., & Trainor, F. R. (1989). The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25(1), 65-70. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00065.x>
- Emami, K., Hack, E., Nelson, A., Brain, C. M., Lyne, F. M., Mesbahi, E., Day, J.G & Caldwell, G. S. (2015). Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. *Scientific Reports*. 5(1). doi:10.1038/srep10036
- Fernandez-Zenoff V., Sineriz, F. y Farias, M.E. (2006). Diverse Responses to UV-B Radiation and Repair Mechanisms of Bacteria Isolated from High-Altitude Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, (72), 7857–7863. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Fox, J. M., & Zimba, P. V. (2018). Minerals and trace elements in microalgae. In *Microalgae in health and disease prevention* (pp. 177-193). *Academic Press*. doi: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00008-6
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater

- microalgae *Ankistrodesmus falcatus*– A potential strain for biofuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367–374. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.086.
- Gorain, P. C., Bagchi, S. K., & Mallick, N. (2013). Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental technology*, 34(13-14), 1887-1894. doi: 10.1080/09593330.2013.812668.
- Ho, S., Xie, Y., Chan, M., Liu, C., Chen, C., Lee, D., Huang, C. & Chang, J. (2014). Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3. *Bioresource technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.062
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*. doi: 10.1155/2010/391632
- Hegewald, E & Nobutaka, H. (2000). Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta). *Algological studies*. 100, 29-49.
- Hegewald, E., Bock, C., & Krienitz, L. (2013). A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Fottea*, 13(2), 149-164. doi: 10.5507/fof.2013.013
- Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2012). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production I: Method and parameters for radiation field simulation. *Photochemistry and Photobiology*, 88, 938–951. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01141.x>
- Ho, S. H., Lu, W. B., & Chang, J. S. (2012). Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. *Bioresource technology*, 105, 106-113. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.091>
- Huber P. (2017). Las picocianobacterias de lagunas pampeanas: diversidad fenotípica y molecular, y su rol en las tramas tróficas planctónicas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Martín (UNSAM). 258pp.
- Huss, V. A., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., ... & Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35(3), 587-598. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x>
- Ibañez, M.V., Leonardi, R.J., Heinrich, J.M., Steingroewer, J., Walther, T., Felix, K. (2020). A rapid assessment of the radiative properties from a suspension of *Chromochloris zofingiensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 3-4. doi: 10.1016/j.jpap.2020.100007
- Ibañez, M.V; Tacca, A.E; Devercelli, M. (2022). *Evaluación de las propiedades ópticas en tiempo real de cultivos de H. pluvialis*. Encuentro de Jóvenes Investigadores EJI 2022. Santa Fe.
- Ilavarasi, A., Mubarakali, D., Praveenkumar, R., Baldev, E. & Thajuddin, N. (2011). Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. *Biotechnology*. 10 (6). 540-545. doi: 10.3923/biotech.2011.540.545
- Jung, C. H., Braune, S., Waldeck, P., Küpper, J. H., Petrick, I., & Jung, F. (2021). Morphology and Growth of *Arthrospira platensis* during Cultivation in a Flat-Type Bioreactor. *Life*, 11(6), 536. doi: <https://doi.org/10.3390/life11060536>
- Jung, J. Y., Yang, J. W., Kim, K., Hwang, K. T., Jung, S. M., & Kwon, J. H. (2015). Cost-efficient cultivation of *Spirulina platensis* by chemical absorption of CO₂ into medium containing NaOH. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(11), 2285-2289. doi: 10.1007/s11814-015-0073-3
- Johnson, J.L., Fawley, M. W. & Fawley, K. P. (2007). The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. *Phycologia*. 46 (2). 214-229. doi: 10.2216/05-69.1
- Kato, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Komárek, J. y Fott, B. (1983). Chlorophyceae, Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (Ed.). Das Phytoplankton des Sdwasswes. Die Binnengewasser 16 (5). Stuttgart: Ed. Schweizerbart'sché

Verlagbuchhandlung.

- Kranz, H. D., Mikš, D., Siegler, M. L., Capesius, I., Sensen, C. W., & Huss, V. A. (1995). The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 74-84.
- Krienitz, L., Huss, V. A., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in plant science*, 20(2), 67-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>
- Landrum, J.T & Bone, R.A.. (2001). Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 28-40. doi:10.1006/abbi.2000.2171
- Lee, E., Heng, R. & Pilon, L. (2013). Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 114. 122-135. doi: 10.1016/j.jqsrt.2012.08.012
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal research*, 12, 497-512. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Leonardi, R. J., Ibañez, M. V., Morelli, M. N., Irazoqui, H. A., & Heinrich, J. M. (2019). Influence of light stratification on the growth of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochemical Engineering Journal*, 148, 97-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.04.022>
- López Arias, T. R., Galeano, E. F., Dos Santos, M., & Bonet, S. R. (2016). Cinética de crecimiento y productividad lipídica del alga *Tetrademus wisconsinensis* S. obtenida en un cuerpo de agua de Paraguay. *Investigación Agraria*.18(1). 22–29.
- Lu, L., Yang, G., Zhu, B., & Pan, K. (2017). A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 46 (11). 2265-2272.
- Luzi, G., & McHardy, C. (2022). Modeling and Simulation of Photobioreactors with Computational Fluid Dynamics—A Comprehensive Review. *Energies*, 15(11), 3966.. doi: <https://doi.org/10.3390/en15113966>
- Lüring, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie*. 39 (2). 85-101. doi: 10.1051/limn/2003014
- Mandal, S. & Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84. 281-291. doi: 10.1007/s00253-009-1935-6
- Marrez, D. A., Naguib, M. M., Sultan, Y. Y., Daw, Z. Y., & Higazy, A. M. (2013). Impact of culturing media on biomass production and pigments content of *Spirulina platensis*. *International Journal of Advanced Research*, 1(10), 951-961.
- Martins, C. B., Assunção, M. F., Ferreira, J. D., & Santos, L. M. (2021). Astaxanthin in microalgae Eustigmatophyceae. in *Global Perspectives on Astaxanthin* (pp. 61-70). *Academic Press*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00011-8>
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant science*, 177(4), 272-280. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.005>
- Melis, A., Murakami, A., Nemson, J. A., Aizawa, K., Ohki, K., & Fujita, Y. (1996). Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* alters photosystem stoichiometry and improves the quantum efficiency of photosynthesis. *Photosynthesis research*, 47, 253-265. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02184286>
- Melis, A., Neidhardt, J., & Benemann, J. R. (1998). *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, 10, 515-525. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1008076231267>
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology*, 17, 477-489. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Meyen FJF (1829) Beobachtungen uber einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica* 14: 768–778
- Morales, E. A., & Trainor, F. R. (1997). Algal phenotypic plasticity: its importance in developing new concepts. The case for *Scenedesmus*. *Algae*, 12, 147-157.

- Napolitano, H. (2010). Diseño de experimentos. *Journal Article*.
- Niizawa, I., Heinrich, J.M. & Irazoqui, H.A. (2014). Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 214-223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.002>
- Niizawa, I., Leonardi, R. J., Irazoqui, H. A., & Heinrich, J. M. (2017). Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochemical Engineering Journal*, 126, 126-134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.006>
- N'Soukpoe-Kossi, C. N., & Leblanc, R. M. (1988). Absorption and photoacoustic spectroscopies of lutein and zeaxanthin Langmuir–Blodgett films in connection with the Haidinger's brushes. *Canadian journal of chemistry*, 66(6), 1459-1466.
- O'Donnell, D. R., Fey, S. B., & Cottingham, K. L. (2013). Nutrient availability influences kairomone-induced defenses in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Journal of Plankton Research*, 35(1), 191-200. doi: 10.1093/plankt/fbs083
- Oliveira, C. Y. B., Oliveira, C. D. L., Prasad, R., Ong, H. C., Araujo, E. S., Shabnam, N., & Gálvez, A. O. (2021). A multidisciplinary review of *Tetradesmus obliquus*: a microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1594-1618. doi: 10.1111/raq.12536
- Parthiban, J. & Jambulingam, R. (2023). Enhancing the biodiesel production potential of *Synechococcus elongatus* and *Anabaena* cyanobacterial strain isolated from saline water using different media composition and organic carbon sources. *Sustainability*, 15, 870. doi: <https://doi.org/10.3390/su15010870>
- Pfaffinger, C. E., Severin, T. S., Apel, A. C., Göbel, J., Sauter, J., & Weuster-Botz, D. (2019). Light-dependent growth kinetics enable scale-up of well-mixed phototrophic bioprocesses in different types of photobioreactors. *Journal of biotechnology*, 297, 41-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.003>
- Pilon, L., Berberoğlu, H., & Kandilian, R. (2011). Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112(17), 2639-2660. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2011.07.004>
- Prata, J.C., da Costa, J.P., Lopes, I., Duarte, A. & Rocha-Santos, T. (2019). Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review. *Science of the Total Environment*. (665), 400–405. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.132
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of applied Phycology*, 26, 1359-1377. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Quigg, A. (2016). The Physiology of Microalgae. *The Physiology of Microalgae*. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_10
- Rahmatpour Nasim et al. (2021). A novel thylakoid-less isolate fills a billion-year gap in the evolution of Cyanobacteria. *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2021.04.042.
- Raven, J. A., & Giordano, M. (2016). Combined nitrogen. *The physiology of microalgae*, 143-154. Doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_7
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis research*, 89, 27-41. doi: 10.1007/s11120-006-9065-9
- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Acién, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J. & Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*. 43 (4). 398-405. doi: 10.1016/j.procbio.2008.01.004
- Sauer, K., & Yachandra, V. K. (2004). The water-oxidation complex in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1655, 140-148. doi: doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.07.004
- Shafik, H. M. (2000). Phenotypic plasticity, colonial formation and growth characters of *Desmodesmus spinosus* and *Scenedesmus obliquus*. *Egyptian Journal of Phycology*, 1 (1 st Int. Symp. Phycol.(ISP).(21-22) Oct. 2000), 181-193. doi: 10.21608/egyjs.2000.113248

- Schediwy, K., Trautmann, A., Steinweg, C., & Posten, C. (2019). Microalgal kinetics—A guideline for photobioreactor design and process development. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 830-843. doi: <https://doi.org/10.1002/elsc.201900107>
- Shah, M.R., Liang, Y., Cheng, J.J. & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*.7. doi: 10.3389/fpls.2016.00531.
- Silva, C. S. P., Silva-Stenico, M. E., Fiore, M. F., de Castro, H. F., & Da Rós, P. C. M. (2014). Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. *Algal Research*, 3, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.012>
- Six, C., Thomas, J. C., Brahmsha, B., Lemoine, Y., & Partensky, F. (2004). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism. *Aquatic Microbial Ecology*, 35(1), 17-29.
- Smith, G. M. (1913). *Tetradismus*, a new four-celled coenobitic alga. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 40(2), 75-87. doi: <https://doi.org/10.2307/2479812>
- Sorokina, K.N; Samoylova, Y.V. & Parmon, V.N. (2020). Comparative analysis of microalgae metabolism on BBM and municipal wastewater during salt induced lipid accumulation. *Bioresource Technology Reports*. 11. 100548. doi: 10.1016/j.biteb.2020.100548
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. C. B. G., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*. 35(2). 171-205.
- Suarez-Montes, D., Borrell, Y. J., Gonzalez, J. M., & Rico, J. M. (2022). Isolation and identification of microalgal strains with potential as carotenoids producers from a municipal solid waste landfill. *Science of The Total Environment*, 802, 149755. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149755>
- Sunda, W. G., Price, N. M., & Morel, F. M. (2005). Trace metal ion buffers and their use in culture studies. *Algal culturing techniques*, 4, 35-63.
- Takache, H., Pruvost, J., & Cornet, J. F. (2012). Kinetic modeling of the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in a photobioreactor. *Biotechnology progress*, 28(3), 681-692. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1545>
- Trainor, F. R. (1996). Reproduction in *Scenedesmus*. *Algae. The Korean Journal of Phycology*, 11(2), 183-201.
- Turpin PLF (1828) De la description de plusieurs genres et especes nouvelles tres remarquables, decouverte parmi les productions vegetales et microscopiques. *Memoires du Musee d'Histoire Naturelle* 16, 295–344.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., ... & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29, 949-982. doi: 10.1007/s10811-016-0974-5
- Wynne, M.J. & Hallan, J.K. (2015). Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*.126. 83–86. doi: 10.1002/fedr.201500021
- Wu, L. F., Chen, P. C., Huang, A. P., & Lee, C. M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 113, 14-18. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.128
- Wu, Y., Guo, P., Zhang, X., Zhang, Y., Xie, S. & Deng, J. (2019). Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *Journal of Hazardous Materials*. (374), 219–227. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.04.039
- Wynne, M. J., & Hallan, J. K. (2015). Reinstatement of *Tetradismus* GM Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*, 126(3-4), 83-86. doi: <https://doi.org/10.1002/fedr.201500021>

- Xia, L., Yang, H., He, Q., & Hu, C. (2014). Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp. NMX451 under nitrogen deficiency and alkaline pH-induced lipid accumulation. *Journal of Applied Phycology*. 27(2), 649–659. doi:10.1007/s10811-014-0371-x.
- Xin, L., Hu H, Gan K. & Sun Y. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101 (14). 5494–5500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Zhang, D., Chanona, E. A. D. R., Vassiliadis, V. S., & Tamburic, B. (2015). Analysis of green algal growth via dynamic model simulation and process optimization. *Biotechnology and bioengineering*, 112(10), 2025-2039. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.25610>
- Zheng, H., Wang, Y., Li, S., Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D-J. & Chang, J-S. (2022). Recent advances in lutein production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 153. 111795. doi: 10.1016/j.rser.2021.111795
- Zittelli, G. C., Mugnai, G., Milia, M., Cicchi, B., Benavides, A. S., Angioni, A., ... & Torzillo, G. (2022). Effects of blue, orange and white lights on growth, chlorophyll fluorescence, and phycocyanin production of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, 61, 102583. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102583>