



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA BIOMASA DE *Isochrysis*
galbana (clon T-ISO) ESTIMULADA CON
RADIACIÓN MONOCROMÁTICA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Miguel Victor Córdoba Matson

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2011

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 7 horas del día 5 del Mes de Diciembre del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de la biomasa de *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) estimulada con radiación monocromática"

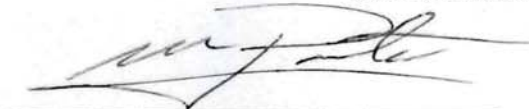
Presentada por el alumno: **Miguel Victor Córdoba Matson**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON

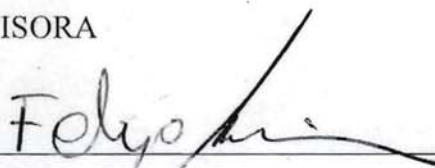
ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

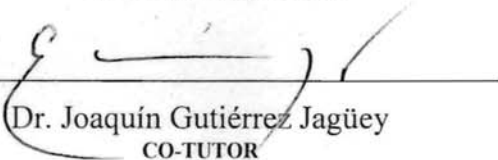
LA COMISIÓN REVISORA



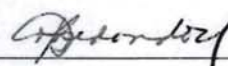
Dr. Miguel Ángel Porta Gándara
CO-DIRECTOR DE TESIS



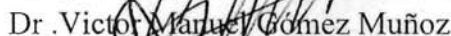
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. Joaquín Gutiérrez Jagüey
CO-TUTOR



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
CO-TUTOR



Dr. Victor Manuel Gomez Muñoz
CO-TUTOR

**DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Miguel Ángel Porta Gándara
Co-Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Co-tutora
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

Dr. Joaquín Gutiérrez Jagüey
Co-tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

Dr. Victor Manuel Gómez Muñoz
Co-tutor
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S. México.

COMITÉ REVISOR

Dr. Miguel Ángel Porta Gándara
Dr. Felipe de Jesús AscencioValle
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Joaquín Gutiérrez Jagüey
Dr .Victor Manuel Gómez Muñoz

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

Dr. Miguel Ángel Porta Gándara
Dr. Felipe de Jesús AscencioValle
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Joaquín Gutiérrez Jagüey
Dr .Victor Manuel Gómez Muñoz

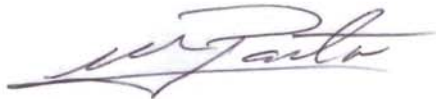
RESUMEN

El desarrollo tecnológico del emisor de luz de diodo (LED) también conocido como diodos electroluminosos ha llevado a su uso como una fuente de iluminación para plantas fotosintéticas para la mejoría de sus características morfológicas, así como la disminución de costos comparados a otras fuentes de iluminación artificiales. En contraste con los cultivos agrícolas, hay pocos estudios con cultivos de microalgas que hayan utilizado LEDs como fuente lumínica y ninguno con *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO), que es una de las microalgas más utilizadas en la acuicultura. Los LEDs proveen iluminación de longitud de onda específica o monocromática y en este estudio se aplicaron LEDs rojos y blancos en un fotobioreactor de tipo Erlenmeyer de 1-L para determinar el crecimiento y la calidad de la biomasa, comparándose con los resultados obtenidos con la luz de lámparas fluorescentes normales. En años recientes el interés en el uso comercial de las microalgas se ha incrementado, por ser ricas en proteínas, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, sin embargo, los costos de producción de la biomasa es costosa, por lo que para que su uso biotecnológico sea económicamente viable, es necesario no sólo optimizar la cantidad de biomasa producida, sino también la cosecha, así como la calidad de luz que se aplica al sistema. La fotosíntesis es un fenómeno físico indispensable para el crecimiento de las microalgas y la producción de biomasa, por lo que la cantidad y calidad de la luz (longitud de onda), es un parámetro importante a considerar. Basado en lo anterior, este trabajo se enfocó a desarrollar dos sistemas que emplearon la luz: (1) para medir la cantidad de la biomasa a través de procesamiento de imágenes digitales; y, (2) para modificar la calidad de la biomasa evaluado en función de la composición de carbohidratos, lípidos y proteínas totales. La microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) fue elegida como el organismo modelo por contener gran cantidad de lípidos totales y ácidos grasos del grupo de los omega-3. Los resultados obtenidos fueron: (1) *Primer línea de investigación: medición de biomasa total*: se desarrolló un sistema para medir la biomasa de las microalgas a través de procesamiento de imágenes digitales. El sistema consiste de una caja oscura conteniendo una lámpara incandescente con voltaje regulado para mantener constante la iluminación. La luz se aplicó en la parte inferior de un matraz Erlenmeyer de un litro de capacidad conteniendo un cultivo de la microalga. La imagen es capturada por una cámara CCD (dispositivo acoplado de carga eléctrica) colocada a 90° del recipiente. La intensidad de la luz reflejada por el cultivo celular es proporcional a la biomasa de la muestra, por lo tanto, permite cuantificar la biomasa de una muestra cualquiera. Las imágenes captadas de una cámara CCD fueron convertidas a imágenes digitales expresadas en píxeles. Posteriormente se procesaron en el software MATLAB para convertir las imágenes de formato RGB a escala de gris (luminosidad). Se generaron las curvas de calibración para tres algoritmos: dos algoritmos estándares de tonos de grises y un modelo (M1) propuesto, y trazadas en función de un conteo celular (cel mL^{-1}) estándar con un contador Coulter. Para evaluar la eficacia de los algoritmos, las tres curvas resultantes fueron contrastadas con respecto a una estimación de muestras desconocidas con distinta densidad celular. El rango de medición

del aparato fue de 1.52×10^6 a 8.10×10^6 cel mL⁻¹, en el que la diferencia porcentual fue menor al 10% respecto al contador Coulter. El algoritmo propuesto M1 dio un mejor ajuste en términos de rango dinámico y provee un esquema aplicable para la medición de biomasa de otras microalgas de distinto color. La ventaja de este sistema para el laboratorio y usos industriales es que además de proporcionar una medida no destructiva de bajo costo también permite estudiar continuamente el crecimiento de las microalgas para una diagnosis temprana. (2) *Segundo línea de investigación: Modificación de la calidad de la biomasa.* Se construyeron dos sistemas de producción de microalgas con luz monocromática utilizando diodos electroluminosos (LEDs). En ambos sistemas se emplearon LEDs (rojos y blancos). En el sistema "A", los LEDs se colocaron en la parte superior del cultivo, mientras que en el sistema "B", iluminaba el cultivo desde la base del matraz. En ambos sistemas "A" y "B" la concentración celular fue siempre más elevada con los cultivos iluminados con luz fluorescente (grupo control). En el grupo control se alcanzó una media de 8.27×10^6 a 10.9×10^6 cel mL⁻¹. Los resultados obtenidos con respecto a la concentración celular, mostraron que la calidad de la luz en *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), a diferencia de las microalgas verdes descritas en la literatura, su replicación fue muy baja con luz de LEDs rojo y blanco independientemente de la intensidad lumínica utilizada posiblemente porque requiere otra longitud o longitudes de onda. En ambos sistemas "A" y "B" los resultados de concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) al final de 5 días de cultivo con LED rojo y blanco y con luz fluorescente eran muy similares. Por ejemplo en sistema "B" el porcentaje para LED rojo, LED blanco y luz fluorescente fueron: 32.2 ± 5.7 , 30.1 ± 2.8 y $27.6 \pm 4.7\%$ (proteínas); 8.7 ± 3.7 , 7.5 ± 1.9 y $8.0 \pm 1.0 \%$ (carbohidratos); y 35.6 ± 7.7 , 38.8 ± 6.8 y 37.8 ± 1.8 (lípidos), respectivamente. En el sistema "A" los resultados fueron muy similares, excepto en el porcentaje de proteínas que fue dos veces menor comparado con el sistema "B".

Palabras clave: biomasa, microalga, *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), procesamiento de imágenes digitales, luz monocromática

Vo. Bo.
Co-directores



Dr. Miguel Ángel Porta Gándara
CIBNOR



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
CIBNOR

ABSTRACT

The development of light emitting diode (LED) technology has led to its use as a light source for photosynthetic crop plants to improve and control morphological characteristics as well as reduce costs compared to other artificial light sources. In contrast to crops, there are fewer studies using LED-based light with microalgae and none cultivating the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO). This is the case even though *I. galbana* (T-ISO) is one of the most commonly cultivated microalgae strains in aquaculture and a candidate for mass cultivation. LEDs are an excellent light source candidate to provide illumination of specific or monochrome wavelength. One of principal component of this study is to apply both red and white LEDs in a small Erlenmeyer-type photobioreactors to determine growth and cell numbers and compares result with standard fluorescent lights. Marine microalgae over time have been generating increased interest in industrial applications as a source of pigments, polysaccharides, vitamins, and long-chain polyunsaturated fatty acids. However, for the biotechnological application of microalgae to realize full economic potential, biomass quantity as well as quality must be well controlled. Light through photosynthesis and photomorphogenesis is the principal source that drives microalgae biomass growth. The basic features of photosynthesis in microalgae have been well described. Research with respect to the quality of light (wavelength) and its effects on the quantity and quality of biomass (percent composition of biomass) have been carried out, nevertheless results have been contradictory. With the intent of aiding in propelling the biotechnological uses of microalgae this thesis develops two systems to study the effects of light: 1) to measure total biomass quantity economically *vis-à-vis* processing of digital images and 2) to alter biomass quality with respect to percent composition of carbohydrates, lipids, and proteins. The golden-yellow *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) was chosen as the model organism because it is representative of a class of microalgae with high economical potential due to containing large quantity of lipids and Omega-3 fatty acids that has been found to be very important for infant development and long term health of adults. The principal results of the two lines of research involving measuring and altering biomass of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) are summarized separately below: *Measuring total biomass*. The determination of algal biomass is fundamental for both industrial and experimental applications and due to its small size presents unique difficulties to measure precisely, economically and swiftly. Hence, a system was developed to measure microalgae biomass by means of digital image processing. The system consists of an apparatus which is essentially a dark box containing a dc voltage regulated incandescent lamp. Light was applied to the bottom of a 1-liter Erlenmeyer flask containing the microalgae and it was found that the intensity of scattered light reflected by the cell culture was proportional to the biomass of the sample thereby allowing quantification. A CCD camera fastened to the exterior of the dark box took the images. Subsequently images were converted into pixels and subsequently processed in MATLAB to convert the RGB image to a modified gray scale image (luminosity). Calibration curves for three different gray scale algorithms were

generated –two gray scale algorithms and a proposed model (M1) and plotted as a function of standard cell count measurements with a Coulter counter. It was found that it was possible to determine biomass within 10% accuracy in comparison to the Coulter counter over density thresholds of 1.52×10^6 and 8.10×10^6 cel mL⁻¹. The M1 algorithm gave a best fit in terms of dynamic range and provides a scheme applicable for measuring biomass of other microalgae with their distinct color fingerprint. The advantage of this system for both laboratory and industrial applications is that in addition to providing a low cost non-destructive measure of biomass allowing for uninterrupted studying of microalgae growth enabling earlier diagnosis. *Altering biomass quality.* Two microalgae production systems utilizing monochromatic light emitting diodes (LEDs) were designed and constructed. Both systems used LEDs (red and white) and Erlenmeyer flasks of 1-L as the bioreactor. System "A" cultivation system had LEDs mounted above while System "B" illuminated the suspension from the base or bottom of the flask. System "A" consisting of six black boxes for applying light within a narrow band wavelength (monochromatic light). In both systems "A" and "B" cell densities was always higher under fluorescent lights (control group). In the control group mean cell densities were from 8.27×10^6 up to 10.9×10^6 cel mL⁻¹. It was shown that the microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO), in contrast to green microalgae described in the literature fails to grow or grows very little with light red or white LEDs regardless of the intensity used possibly because it requires another length or wavelengths. In both systems "A" and "B" average concentration results for biomass of protein, carbohydrates, lipids at the end of 5 days of culture with red and white LEDs and fluorescent light (control group) were very similar. For example, in system "B" the percentage of biochemical content for red LEDs, white LEDs and fluorescent light are respectively: 32.2 ± 5.7 , 30.1 ± 2.8 and $27.6 \pm 4.7\%$ (protein), 8.7 ± 3.7 , 7.5 ± 1.9 and $8.0 \pm 1.0\%$ (carbohydrates) and 35.6 ± 7.7 , 38.8 ± 6.8 and 37.8 ± 1.8 (lipids). System "A" percentage results of biochemical content was also similar except for protein content which was a factor of 2 lower compared to system "B" for all light treatments.

Key words: microalgae biomass, *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO), cell count, digital image processing, monochromatic light

PREFACIO

Esta tesis está basada en los siguientes artículos y manuscritos que serán referidos por sus números romanos (I-II):

Artículos y manuscritos

(I) Córdoba-Matson M. V., Porta-Gándara M.A. and Gutiérrez, J. (2010). Evaluation of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) biomass by means of processing of digital images (Manuscrito publicado en *Journal of Applied Phycology* 2010, 22:427–434).

(II) Córdoba-Matson M. V., Arredondo-Vega, B.O. Ascencio F., and Carreón L. Evaluation of growth, cell size and biomass quality of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) with two LED light regimes (Manuscrito enviado el 6 de diciembre de 2011 al *Journal of Applied Phycology*).

DEDICATORIA

A mi madre, **Yvonne Matson de Córdoba**,
por quererme y apoyarme en en todo.

A mi padre, **Félix Víctor Córdoba Alva**, por
haberme llevado a conocer La Paz.

AGRADECIMIENTOS

Creo esta parte de la tesis es la que resulta más difícil de escribir para todos los que estudiamos el posgrado. Es tanta la gente que nos apoya de una u otra manera, que tenemos aprensión de omitir por descuido a alguien significativo. En el CIBNOR encontré apoyo siempre que lo requerí. Le doy las gracias a las innumerables personas, invaluable por su trabajo eficiente, en las diferentes áreas del CIBNOR como en Posgrado, Administración, Biblioteca, Informática y Redes. A todos aquellos que tras bambalinas operan calladamente en la logística del CIBNOR. Ha sido un placer conocerlos. Por esto y de antemano, les ofrezco una disculpa si fallo al no mencionarlos específicamente.

Primero, un agradecimiento especial a mis codirectores de tesis, Dr. Miguel Ángel Porta Gándara y Dr. Felipe Ascencio Valle, que me dieron las facilidades y autonomía para llevar a cabo mi trabajo de investigación. Gracias por los consejos brindados y la mano dura cuando era necesario para mi formación doctoral.

Mi profundo gratitud a los miembros de mi comité tutorial y revisor de tesis: Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dr. Joaquín Gutiérrez y Dr. Víctor Manuel Gómez Muñoz por sus aportaciones, críticas, comentarios, sugerencias y por compartir conmigo su experiencia. Aunque a veces no los veía muy seguido siempre estaban disponibles para escucharme.

Al CONACYT por la beca No. 211773 otorgada para mis estudios de posgrado.

Mil gracias a todo el personal de posgrado del CIBNOR: Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Dra. Thelma Castellanos Cervantes, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Elizabeth Olachea León, Beatriz Adriana Gálvez González, y María Guadalupe Sánchez Vázquez, por su apoyo en todos los trámites académicos que me ayudaron a concluir satisfactoriamente mis estudios.

A la M. en C. Laura Carreón, por su apoyo y asistencia en el laboratorio y respaldo, que me permitieron llevar mi trabajo. Gracias por tu ayuda, buen humor y paciencia.

A Marte Félix Virgen (“El Comandante”) por capacitarme y apoyarme en el manejo de las cepas y en la preparación de los inóculos y todas las facilidades otorgadas.

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Microalgas del CIBNOR que me han apoyado técnicamente, Julián Alfonso Garzón Favela, Adriana Greene Yee, Cynthia Elizabeth Aldana Avilés y Eleonora Puente Carreón.

Muchas gracias a Jesús Martín Ramírez Orozco del Laboratorio Biomedicina Bioquímica y Molecular por su apoyo técnico.

Por su excelente apoyo técnico en armar los sistemas, al Ing. Juan Francisco Villa Medina. Muchas gracias Francisco. Igualmente al M. en C. Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por el apoyo técnico para poder liofilizar y quemar mis muestras. Gracias.

Agradezco al Dr. Alfonso Maeda y a Rosa Linda Salgado García por apoyarme y felicitarme el uso del Coulter Counter.

A la Dra. María Concepción Lora Vilchis por sus atinados consejos respecto a la realización de este trabajo. Sencillamente gracias.

A los Sres. Jorge Cobos Anaya y Alfonso Alvarez Casillas por su excelente trabajo en elaborar el chasis del sistema para medir biomasa y el chasis para generar luz monocromática, en el taller de Maquinados del CIBNOR. Su calidad de trabajo es estupenda, estoy muy agradecido.

A Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga, responsables del Laboratorio de Cómputo, por su desinteresado apoyo y facilidades conferidas. Gracias: es un gusto conocerlos y relacionarme con ustedes.

Agradezco a Arturo Pedro Sierra Beltrán que con sus conocimientos y apoyo técnico me ayudó a realizar mi trabajo experimental.

Agradezco a Ariel Arturo Cruz Villacorta, técnico responsable del Laboratorio de Microscopía Electrónica por las micrografías de la microalga *Isochrysis galbana* (T-ISO), en apoyo de mis imágenes.

Gracias también a Carmen Rodríguez Jaramillo y María Eulalia Meza Chávez del Laboratorio de Histología e Histoquímica por apoyarme en la preparación de muestras.

Agradezco al Dr. Renato Mendoza, M.C. Edgar Amador, M.C. Angel Edgardo Carrillo García, y Dr. José Luis León De La Luz, por su apoyo brindado, sugerencias, por las placenteras charlas y por su amistad.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del CIBNOR, alumnos de doctorado, de maestría y de la Unidad de Patología Marina.

A María de Jesús Romero (“La Chula”) y a su hermana Reina Romero por la ayuda que siempre me han manifestado.

Al Dr. Francisco López, su esposa Linda y su bella familia Amarela y Frangel que siempre me han apoyado.

Al Dr. David Auriolés por ser un amigo cuando lo necesitaba, espero regresarle el favor algún día.

Mi agradecimiento a todos los choferes del camión, especialmente a Pilar Lucero Geraldo, que me llevó casi diario con seguridad al CIBNOR y a mi casa. Su puntualidad y eficiencia es de calidad envidiable.

Finalmente mis agradecimientos no serían completos sin reconocer a mi papá, el Dr. Félix Córdoba Alva† quien fundó este Centro hace más de 36 años, y fue su primer director. Al Dr. José Luis Ochoa Ochoa† por ser con mucho, artífice del devenir del CIBNOR que hoy conocemos. Reconozco sus esfuerzos y aplaudo su visión.

ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
PREFACIO	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
ÍNDICE	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABLAS	xx
1.0 INTRODUCCIÓN	1
Importancia biotecnológica del cultivo de microalgas	1
2.0 ANTECEDENTES	5
2.1 MEDICIÓN DE LA BIOMASA Y CONCENTRACIÓN CELULAR	5
2.1.1 Métodos directos	6
2.1.2 Métodos indirectos	7
Oxígeno disuelto	8
Contador Coulter	9
Fluorescencia	9
Nefelometría	10
Densidad óptica	10
Bioluminiscencia o quimioluminiscencia de ATP	11
Microscopia de Epifluorescencia	11
Fotoacústica	12
2.2 MODIFICACIÓN DE LA BIOMASA CON LUZ MONOCROMÁTICA	12
Mayoría de los estudios varían solamente la intensidad lumínica	14
Luz monocromática y diodos electroluminosos (LEDs)	14
Modelo biológico: <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) UTEX LB 2307	15
2.3 PROPÓSITO DEL ESTUDIO	17
3.0 JUSTIFICACIÓN	19
3.1 Uso de la luz para medir la biomasa con imágenes digitales	19
3.2 Aplicación de la luz monocromática para modificar la calidad de la biomasa	20
4.0 HIPÓTESIS	21
4.2 HIPÓTESIS 1	21
HIPÓTESIS 1 ALTERNA	21
4.3 HIPÓTESIS 2	21
HIPÓTESIS 2 ALTERNA	21
5.0 OBJETIVOS	22
5.1 General (Hipótesis 1):	22
5.1.1 Particulares (Hipótesis 1):	22
5.2 General (Hipótesis 2):	22
5.2.1 Particulares (Hipótesis 2):	22

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA	23
6.1.1 Cultivo de la microalgas	23
6.1.2 Cuantificación de la biomasa de celular	24
6.1.3 Sistema de captura de imágenes (Sistema 1)	24
6.1.4 La teoría y la configuración de la cámara.....	27
6.1.5 Procesamiento digital de imágenes.....	29
6.1.6 Análisis estadísticos.....	34
6.2 SISTEMA DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDs).....	34
6.2.1 Sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática.....	34
6.2.2 Sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática.....	38
6.2.3 Fuentes lumínicas	41
6.2.4 Preparación del inóculo	41
6.2.5 Experimentos	41
6.2.6 Determinación de la tasa de crecimiento poblacional	42
6.2.7 Determinación de las duplicaciones diarias en la tasa de crecimiento poblacional.....	43
6.2.8 Determinación de tiempo de duplicación poblacional.....	43
6.2.9 Análisis de peso seco de <i>I. aff. galbana</i> (T-ISO).....	43
6.2.10 Contenido bioquímico de la biomasa de <i>I. aff. galbana</i> (T-ISO).....	44
Cuantificación de lípidos totales.....	44
Cuantificación de proteínas totales.....	45
Cuantificación de carbohidratos totales.....	46
6.2.11 Análisis estadístico	47
7.0 RESULTADOS	48
7.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA	48
7.1.1 Generación de la curvas de calibración	48
7.1.2 Evaluación de biomasa desconocida.....	50
7.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS)	51
7.2.1 LED ROJO sistema “A”	51
7.2.2 LED BLANCO sistema “A”.....	52
7.2.3 LED ROJO sistema “B”	53
7.2.4 LED BLANCO sistema “B”.....	54
7.2.5 LUZ FLUORESCENTE (grupo control).....	55
7.2.6 Determinación de productividad.....	56
7.2.7 Crecimiento LED ROJO, BALNCO y LUZ FLUORESCENTE.....	56
7.2.10 Tamaño de micoralgas con LEDS ROJO y BLANCO y con LUZ FLUORESCENTE (grupo control)	60
7.2.11 Contenido Bioquímico.....	61
8.0 DISCUSIÓN	63
8.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA	63
8.1.1 Generación de la curva de calibración.....	63
8.1.2 Evaluación de biomasa desconocida.....	63
8.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS).....	65
8.2.1 Densidad y tamaño celular.....	65

8.2.2 Productividad.....	65
8.2.3 Crecimiento.....	66
8.2.4 Imágenes de fotografías microscópicas de tamaño celular.....	66
8.2.5 Composición bioquímica celular	67
9.0 CONCLUSIONES.....	68
9.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA	68
9.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS)	68
LITERATURA CITADA	71
ANEXOS	89
<i>Anexo 1- Primer artículo</i>	90
<i>Anexo 2- Segundo artículo</i>	91

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Ilustración del Códice Florentino que demuestra cómo los aztecas cosecharon *Spirulina* de los lagos, desnatando la superficie con cuerdas y después secando las algas en tortas cuadradas que serían usadas como condimento en la alimentación.2
- Fig. 2. Intensidad de radiación solar a nivel del suelo. Las líneas punteadas indican la longitud de onda para fotosintetizar (ASTMM 2008 American Society for Testing and Materials, ASTM). 13
- Fig. 3 Imagen de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Copyright 1995-2009 Protist Information Server). 16
- Fig. 4. Diagrama de flujo general del proyecto de investigación. 18
- Fig. 5. Diagrama del sistema de instrumentación (aparato 1) propuesto para medir la biomasa que consta de tres secciones interrelacionadas: i) unidad para la muestra, ii) una fuente de luz de cámara y iii) una cámara de los componentes eléctricos.....25
- Fig. 6 Fotografía del sistema actual (aparato 1) para realizar medición de biomasa de las microalgas a través de imágenes digitales.26
- Fig. 7. Región de Interés (ROI) es el área para obtener valores de RGB y convertirlo a escalas de grises y obtener la densidad celular o biomasa. Consiste de 6,498 píxeles (114 columnas x 57 filas).29
- Fig. 8. Diagrama de flujo para calcular tonos de grises de las imágenes digitales. La subrutina “Apply Algorithms” incluye algoritmos para las modelos estándar de tonos de gris (GS1, GS2) e igual que un algoritmo para el modelo propuesto (M1), lo cual optimiza el rango dinámico para el color específico de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO). 30
- Fig. 9. Análisis de regresión entre los valores de color de RGB (rojo, verde y azul) y el número de células por mililitro.33
- Fig. 10. Diagrama del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los 6 cajas negras (3 LED rojos y 3 LED blancos). La luz generada de los LEDs se aplica de un tapón especialmente diseñado para sujetar el LED. En los matraces 7, 8 y 9 (control) se utiliza luz de un tubo fluorescente blanco (General Electric Co. Mexico,

Mexico) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocado horizontalmente al lado (no mostrado en diagrama).	35
Fig. 11 Elementos del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática. Diagrama de (A) tapón especialmente diseñado para sostener LEDs para matraces Erlenmeyer de 1-Litro y (B) detalle fotográfico de un matraz de 1-L con el tapón y LED rojo encendido donde se aprecia el ángulo estrecho de luz la cual genera el LED. El tapón de plástico para sujetar LEDs fue diseñado y elaborado en el taller de maquinados del CIBNOR.	36
Fig. 12 Detalle fotográfico del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los LEDs rojos y blancos encendidos.....	37
Fig. 13 Detalle fotográfico del panel de control del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestran los 6 microcontroladores PIC16F84A y el regulador de voltaje AC a DC.	37
Fig. 14. Diagrama del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los 3 LEDs rojos y 3 LEDs blancos (1 a 6). La luz generada de los LEDs se aplica desde la base la cual genera una intensidad luz más elevada que sistema “A”. En los matraces 7, 8 y 9 (control) se utiliza luz de un tubo fluorescente blanco (General Electric Co. México, México) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocado horizontalmente al lado (no mostrado en diagrama). Las flechas indican donde están localizados los LED, cerca de la base del matraz.....	38
Fig. 15. Detalle fotográfico de los elementos del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra en la fotografía izquierda: (A) LED, (B) LENTE, (C) ESPEJO parabólica y (D) BASE; a la derecha se muestra un matraz en su base protegido de la luz externa con papel aluminio.	39
Fig. 16. Detalle fotográfico de los elementos del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra: (A) el sistema con los LEDs rojos y blancos encendidos; y, (B) el sistema con los matraces en sus bases protegidos de luz externa con papel aluminio (RL= LED rojo, WL = LED blanco).	40
Fig. 17 Detalle fotográfico del controlador de tiempo en el sistema sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática.....	40
Fig. 18. Análisis de regresión de dos algoritmos de escala de grises (GS1 = MATLAB, GS2 = Gonzales & Woods) y el número de células por mililitro de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-ISO).....	48
Fig. 19. Análisis de regresión de luminiscencia algoritmo propuesto (M1) y el número de células por mililitro de <i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-ISO).	49

- Fig. 20. Número de células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema “A” a una intensidad lumínica de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las gráficas 1R(T0), 2R(T0) y 3R(T0) corresponden al tiempo cero y 1R(T5), 2R(T5) y 3R(T5) al tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en tamaño o número de células ($P > 0.05$, $n=3$).51
- Fig. 21. Número de células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED BLANCO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema “A” ($n=3$) a una intensidad lumínica de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las gráficas 1B(T0), 2B(T0) y 3B(T0) corresponden a tiempo cero y 1B(T5), 2B(T5) y 3B(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. . No hubo diferencias significativas en tamaño o número de células ($P > 0.05$, $n=3$).52
- Fig. 22. Numero células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO en tiempo cero (T0) y tiempo 5 días (T5) en sistema “B” ($n=3$) a una intensidad lumínica de $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las gráficas 1R(T0), 2R(T0) y 3R(T0) corresponden a tiempo cero y 1R(T5), 2R(T5) y 3R(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en tamaño o número totales de células mL^{-1} ($P > 0.050$). ($n=3$) .53
- Fig. 23. Número células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED BLANCO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema “B” ($n=3$) a una intensidad lumínica de $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las gráficas 1B(T0), 2B(T0) y 3B(T0) corresponden a tiempo cero y 1B(T5), 2B(T5) y 3B(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en número de células ($P > 0.05$) pero sí hubo diferencias en tamaño ($P < 0.05$, $n=3$).54
- Fig. 24. Detalle fotográfico de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LEDs rojo y blanco y luz fluorescente (grupo control) después de 5 días de tratamiento de luz en el experimento con sistema “B”. (RL= LED rojo, WL = LED blanco, FL=Luz Fluorescente (100X)).60
- Fig. 25. Porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) al final de 5 días de cultivo en sistema “B” con LED ROJO y BLANCO, con luz FLUORESCENTE . Los datos son la media \pm la desviación estándar ($n=3$).62

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros seleccionados de la cámara CCD para capturar las imágenes.	29
Tabla II. Tipo de luz y fotoperiodo seleccionado en cada matraz para cada bioensayo.	42
Tabla III. Comparaciones de densidad celular de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) ($\times 10^6$ células mL ⁻¹) con el estándar electrónico de conteo de células (EC) utilizando un contador Coulter y los tres algoritmos para procesar imágenes digitales (GS1, GS2 y M1). Entre paréntesis intervalos al noventa y cinco por ciento de confianza.	50
Tabla IV. Productividad en mg/L/día de la microalga <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) en sistemas “A” y “B” con diferentes aplicaciones de luz. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=3).	56
Tabla V. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular (η g/cel), Crecimiento poblacional μ e (d ⁻¹), Crecimiento poblacional de duplicación μ 2(d ⁻¹) y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) en sistemas “A” y “B” con LED ROJO. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).	57
Tabla VI. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular (η g cel ⁻¹), Crecimiento poblacional μ e (d ⁻¹), Crecimiento poblacional de duplicación μ 2 (d ⁻¹) y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) en sistemas “A” y “B” con LED BLANCO. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).	58
Tabla VII. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular (η g cel ⁻¹), Crecimiento poblacional μ e (d ⁻¹), Crecimiento poblacional de duplicación μ 2 (d ⁻¹) y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) en sistemas “A” y “B” con luz FLUORESCENTE (grupo control). Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).	59
Tabla VIII. Concentración promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> (T-ISO) al final de 5 días de cultivo en sistemas “A” y “B” con LED ROJO y BLANCO y con luz FLUORESCENTE (FL). Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=6)	61

1.0 INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos eucariontes fotosintéticos muy diversos en color, forma, tamaño y capacidad de adaptación a distintos ambientes. Se encuentran casi en cualquier hábitat donde el agua y la luz solar coinciden, incluyendo suelos, hielo, lagos, ríos, aguas termales y el océano. Las microalgas junto con las cianobacterias representan solamente alrededor de 1-2% de la biomasa de carbono en el mundo (Wozniak & Dera 2000), pero se estima que fijan entre 30 y 50 $\times 10^{15}$ g del carbón anualmente que es cerca de 40% de la fijación mundial de carbono (Falkowski, 1994; Sakshaug *et al.*, 1997; Field *et al.*, 1998) y forman una parte esencial en el primer eslabón de la cadena trófica de organismos (Wozniak & Dera, 2000). El fitoplancton (microalgas y cianobacterias) juega un papel esencial en carbono global (JOGFS, Steinberg *et al.*, 2003). Por estas razones y por su influencia global en la biósfera, el estudio de las microalgas es de interés fundamental para los científicos del mundo.

Importancia biotecnológica del cultivo de microalgas

Por siglos las microalgas han sido utilizadas como alimento por las poblaciones indígenas. El padre Fray Bernardino de Sahagún (1499-1590) documentó que en el Lago de Texcoco los aztecas cosechaban *Spirulina* en el Códice Florentino (Fig. 1). De hecho, las algas verdeazules incluyendo especies como *Nostoc*, *Arthrospira* (*Spirulina*) y *Aphanizomenon* se han cosechado con fines alimenticios por miles de años por nativos en todo el mundo en sitios como China, Sudamérica y África donde crecía naturalmente en lagos (Jensen *et al.*, 1997).

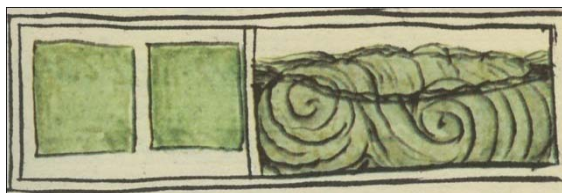


Fig. 1. Ilustración del Código Florentino que demuestra cómo los aztecas cosecharon *Spirulina* de los lagos, desnatando la superficie con cuerdas y después secando las algas en tortas cuadradas que serían usadas como condimento en la alimentación.

Sin embargo, el cultivo de microalgas es relativamente nuevo (Borowitzka, 1999) y comenzó a principio de los años 50, surgido por predicciones de escasez en el consumo de proteicos. La biomasa de las microalgas pareció en aquel momento como un buen candidato con este fin (Becker, 2004). Simultáneamente, en este período comenzó el estudio sistemático de las microalgas para extraer sustancias biológicamente activas, particularmente antibióticos (Borowitzka, 1995).

El cultivo industrial de microalgas en gran escala comenzó en los años 60 en Japón con la producción de *Chlorella* por la compañía Nihon Chlorella (Taipei, Taiwán) (Becker, 2004; Muller-Feuga, 1996; Iwamoto, 2004). Fue seguida a principios de los años 70 por Sosa Texcoco S.A. (México, D.F.) que estableció la cosecha de *Arthrospira* la cual era cultivada en el lago Texcoco, llegando a tener una producción anual de 500 toneladas (Becker, 2004). Desafortunadamente, la empresa Sosa Texcoco cerró y la producción fue abandonada (Spiral Spring, 1991; Spiral Spring, 2005). Los primeros cultivos también aparecieron en los años 70 (Pulz & Scheibenbogen, 1998). Por los años 80, había 46 fábricas grandes en el oriente produciendo más de una tonelada por mes de microalgas, principalmente *Chlorella* (Spolaore *et al.*, 2006).

Igualmente, en 1986 comenzó principalmente por compañías australianas la producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de β -carotenos (Spolaore *et al.*, 2006). Éstos pronto fueron seguidos por otras plantas comerciales en Israel y los E.E.U.U. En semejante periodo, igual que las microalgas mencionadas, la producción a gran escala de cianobacterias comenzó en la India. Más recientemente, se han establecido en los

E.E.U.U. y la India plantas para producir *Haematococcus pluvialis* como fuente de astaxantina (Spolaore *et al.*, 2006).

El mercado mundial para fórmulas infantiles y sus derivados se estima en alrededor de 10 mil millones de dólares anuales (Ward & Singh, 2005). Martek es el líder mundial en el abastecimiento del aceite de DHA como complemento alimenticio en fórmulas infantiles. El DHA de Martek se deriva de la microalga *Cryptocodinium cohnii* y con un 40-50% DHA, no contienen EPA u otro ácido graso de cadena larga (Jiang *et al.*, 1999; Ratledge, 2004; Ward & Singh, 2005). El aceite de Martek está disponible en más de 60 países por todo el mundo (incluyendo México, China, Estados Unidos y Canadá). Las ventas anuales de Martek exceden más de 350 millones de dólares (Martek, 2008).

Igualmente, las microalgas son aplicadas para recuperación de la calidad de aguas residuales y la fermentación de metano a partir de la biomasa (Pulz & Scheibenbogen, 1998), para retirar metales (Kaplan, 2004; Radway *et al.*, 2001), para producir compuestos químicos valiosas (Arad & Richmond, 2004), para producir isótopos marcados con hidrógeno o compuestos de nitrato (NO₃) y de agua (H₂O) (Apt & Behrens, 1999), como fuente de energía renovable (combustibles biológicos) sustentable ocasionado por las crisis de energía en los años 70 (Chaumont, 1993; Cornet *et al.*, 1998; Pulz & Scheibenbogen, 1998), y últimamente debido a los altos precios del petróleo (Chisti, 2008; Um & Kim, 2009; Demirbas, 2009; Maharajh & Laloo, 2009; Meng *et al.*, 2009).

Asimismo, existen numerosos antecedentes detallando que las microalgas marinas son una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados esenciales (Borowitzka, 1988c; Cohen, 1999; Atalah *et al.*, 2007). Los lípidos de células microalgales se componen de glicerol, azúcares o de bases esterificados de ácidos grasos saturados o no saturados (de 12 a 22 átomos de carbón). El contenido lípido varía entre el 1% hasta 70%, pero puede alcanzar el 90% de peso seco (Metting, 1996).

Se conoce que la biomasa de algunas especies de microalgas es de alto valor proteico y es una de las razones principales de considerarlas como fuente de proteína (Soletto *et al.*, 2005). Además, muchos estudios metabólicos han confirmado la capacidad de las microalgas como una nueva fuente de proteína. La calidad proteica de la mayor parte de las microalgas examinadas es igual o aún superior al de otras proteínas de origen

vegetal convencionales (Becker, 2004). Las células de las microalgas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, éstas pueden ser fuente de los aminoácidos esenciales para los seres humanos y los animales (Guil-Guerrero *et al.*, 2004).

Los carbohidratos en las microalgas se pueden encontrar en forma de almidón, glucosa, azúcares y otros polisacáridos. Su digestibilidad total es alta, por lo tanto es posible usar las microalgas enteras secadas en alimentos (Becker, 2004).

Las microalgas son también ricas en pigmentos como la clorofila (0.5% al 1% de peso seco), carotenos y las ficobiliproteínas (Spolaore *et al.*, 2006). Estas moléculas tienen una amplia gama de usos comerciales. Por lo tanto, la composición de la biomasa microalgal posee calidades interesantes que pueden ser aplicadas para la nutrición humana y animal. Las microalgas también representan una fuente valiosa de casi todas las vitaminas esenciales como nicotinato, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, y E (Becker, 2004).

Las vitaminas mejoran el valor alimenticio de las células microalgales pero su cantidad fluctúa dependiendo del género y especie, así como de los factores ambientales, el tratamiento de cosecha y el método de secar las células (Borowitzka, 1988a; Brown *et al.*, 1999).

Por otra parte, el interés en el cultivo de microalgas se ha considerado en los proyectos de viajes espaciales, con fin de utilizarlas para conversión fotosintético de CO₂ y H₂O a O₂, así como complemento alimenticio (Oguchi *et al.*, 1989; Lehto *et al.*, 2006).

La biomasa microalgal de depósitos fósiles fue utilizada por Alfred Nobel para la adsorción de la nitroglicerina para crear dinamita (Pulz & Gross, 2004). Hoy en día, el mercado microalgal de la biomasa produce cerca de 5000 ton de materia seca por año y genera aproximadamente US\$ 1.25×10⁹/año (Pulz & Gross, 2004). Así, en un período relativamente corto de 40 años, la industria biotecnológica de microalgas ha crecido y diversificado.

Como fue descrito anteriormente, el interés en el cultivo de microalgas ha ganado considerable importancia en las últimas décadas (Cohen, 1986; Borowitzka, 1986; Borowitzka, 1992; Abalde *et al.*, 1995; Molina Grima *et al.*, 2003), sin embargo, el costo de cultivar microalgas para extraer productos bioactivos o de alto valor agregado, sigue siendo

costoso en comparación con otras alternativas. Por ejemplo, el costo de harina de pescado hoy en día es de alrededor de 1.20dls/kg (FAO, 2008) mientras el costo de producir microalgas en sistemas tipo “raceway” es alrededor de 8 a 15 dls/kg (Hedge, 2006). Es necesario herramientas y métodos de cultivo de bajo costo para que la industria sea competitiva.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 MEDICIÓN DE LA BIOMASA Y CONCENTRACIÓN CELULAR

La determinación de la biomasa es fundamental para la mayoría de los usos industriales y para estudios experimentales con microalgas (Rusch & Christensen, 2003) y debido a sus dificultades únicas lo cual presenta su tamaño pequeño es difícil medir con alto nivel de precisión (Madrid & Felice, 2005). En el laboratorio así como en la industria, la medición temporal periódica de la biomasa de un cultivo es superior a la medición esporádica para tomar decisiones vitales con respecto a la iluminación, a la temperatura, a la fertilización y a la cosecha eventual. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema para medir biomasa es importante para el laboratorio y para optimizar procesos de producción y reducir los costos (Rusch & Malone, 1998; Gitelson *et al.*, 2000; Sandnes *et al.*, 2006).

La biomasa de las microalgas se expresa típicamente como peso por unidad de volumen (mg mL^{-1}) o como número de células por unidad de volumen (cel mL^{-1}). Las técnicas directas más aceptadas para medir la biomasa de microalgas son peso seco o por recuento celular, sin embargo estos métodos son destructivos y una alícuota debe ser tomada (Madrid & Felice, 2005).

Existen actualmente muchos métodos en la literatura científica para medir la cantidad total de la biomasa microalgal. Para ello, desde la perspectiva de organizar la enorme cantidad de técnicas de medición de biomasa, se escogió dividir los métodos existentes en dos grupos principales.

Métodos directos. Son aquellos que involucran pesar o contar células.

Métodos indirectos. Son los que utilizan cálculos de parámetros físicos o químicos para inferir la cantidad de biomasa.

2.1.1 Métodos directos

Por lo anterior y desde un punto de vista de las definiciones anteriores realmente sólo existen dos métodos que podrían clasificarse directos para estimar la biomasa microalgal los cuales incluyen: (1) el peso seco o húmedo y (2) recuento al microscopio.

La medida directa más aceptada para medir la biomasa microalgal total es el método del peso seco o húmedo (Madrid & Felice, 2005; Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). En este método las células en una muestra pueden ser separadas del medio de cultivo y son pesadas mientras que están húmedas, o las células pueden ser secadas antes de pesar. La densidad celular se puede cuantificar de dos maneras básicas: como gramos de peso seco o húmedo por volumen de muestra. El pequeño tamaño de cada célula microalgal (típicamente, de algunos micrones), no permite la medida del peso de cada célula individual. Por lo tanto, la biomasa con respecto a la tasa de crecimiento específica en cultivos de microalgas se expresa típicamente como peso por unidad de volumen o como número de células por unidad de volumen. Las ecuaciones para el cálculo de peso seco (total y orgánico) y cenizas están documentados en detalle por Arredondo-Vega & Voltolina (2007). Sin embargo, aún cuando el protocolo para medir peso seco sea un método ampliamente utilizado, puede ser inexacto si el medio de cultivo contiene otros materiales insolubles como los que se encuentran habitualmente en una fermentadora (Madrid & Felice, 2005). Además, este método no puede distinguir las células viables de las muertas.

Para determinar la concentración celular el conteo microscópico con hemacitómetro es el método más aceptado y utilizado. Fue originalmente desarrollado por la industria médica para contar leucocitos, eritrocitos y plaquetas, pero también se utilizan hoy en día para contar microalgas (Edmonton, 1974; Semina, 1978). Un hematocitómetro es un vidrio moldeado que típicamente posee dos compartimientos y cada compartimiento tiene una rejilla microscópica grabada en la superficie del cristal de volumen conocido. Existen varios tipos de hematocitómetro para contar diferentes tamaños de células. Por ejemplo, la cámara de Neubauer sirve para el recuento de células relativamente pequeñas ($\sim 1 \mu\text{m}$ hasta $30 \mu\text{m}$) o las cadenas cortas (McVey, 1993). Mientras que las células más grandes (> 50

μm), o cadenas largas de células, se cuentan más apropiadamente con una cámara de Sedgewick (Palmer Maloney, 1954). Para todos los hematocitómetros, la manera fundamental del recuento celular es contar los números de células en cada uno de los cuadrados de volumen conocido. Existen principalmente 5 cámaras o hematocitómetros para el recuento de microalgas. Para realizar el recuento celular es necesario mantener una dilución adecuada de alrededor de $5 \times 10^4 - 10^7$ células mL^{-1} (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007, Villafaña & Reid, 1995). Densidades más grandes son imprecisas y difíciles de contar manualmente por cansancio visual. En esos casos diluciones son realizadas para facilitar el conteo. Para el recuento de las células no móviles que no necesitan fijación se puede realizar recuentos inmediatamente cuando se colecciona la muestra. El fijador más común usado para las microalgas marinas es solución de lugol. Sin embargo, si hay un retardo entre la colección de la muestra y la cuenta, o si las células son móviles entonces la muestra necesitará ser preservada.

2.1.2 Métodos indirectos

Los métodos directos para medir biomasa como peso seco y el recuento microscópico con el hematocitómetro son laboriosos, consumen mucho tiempo, destructivo y típicamente una alícuota debe ser tomada (Madrid & Felice, 2005). Por lo tanto, muchos métodos “indirectos” cuantitativos se han desarrollado y se han adoptado para medir la biomasa de microalgas: métodos ópticos, pigmentos extraídos, fluorescencia, determinaciones químicas, cuentas de célula electrónicas y nefelometría (Palmer & Maloney, 1954; Sheldon & Parsons, 1967; Strickland & Parsons, 1972; Stein, 1973; Hallegraeff, 1977; Sornia, 1978; Vanous, 1979; Butterwick *et al.*, 1982; Grasshoff *et al.*, 1983).

Por otra parte, existen otros métodos que podrían ser adaptados para medir biomasa de microalgas como espectrofotometría de dieléctricos (Stoicheva *et al.*, 1989), radio frecuencias para biomonitorio de cultivos de plantas (Markx *et al.*, 1991), o en levaduras (Nicholson *et al.*, 1996), incluso hay unos métodos de procesamiento de imágenes con microscopia para patogénesis de plantas (Sedlář *et al.*, 2008). A continuación se resumen

las técnicas más comunes para medir biomasa en microalgas además de algunas técnicas innovadoras.

Oxígeno disuelto

Históricamente el oxígeno ha sido un gas ampliamente estudiado porque es de gran interés para los físicos que estudian la circulación de las masas de agua en las profundidades del océano, así como a los biólogos que examinan las variaciones de oxígeno debido a procesos biológicos (Kester, 1975; Kamykowski & Zentara, 1990; Fiedler & Talley, 2006).

La cantidad de oxígeno disuelto por respiración de una suspensión de microalgas puede ser asociada directamente a la biomasa total. Li *et al.* (2003) utilizó la técnica de medir oxígeno disuelto para estimar biomasa, aunque normalmente no se mide la cantidad de oxígeno para calcular directamente la cantidad de biomasa.

La concentración de oxígeno disuelto en el agua de mar se define como mililitros de gas oxígeno (O₂) por litro de agua de mar (mL L⁻¹). El método estándar para medir el oxígeno disuelto es por el método propuesto por primera vez por Winkler (1888) hace más de 120 años, y es sorprendente que es aún considerado como el método más exacto y preciso de medición de oxígeno disuelto (APHA, 1998). Este método fue modificado por Strickland y Parsons (1968). La técnica convencional de titulación de Winkler (Strickland & Parsons, 1968) se atribuye un coeficiente de variación de 0.5% (Carpenter, 1965). Las únicas modificaciones recientes son de medir el punto final espectrofotométricamente en vez de visualmente (Maeda-Martinez, 1985; Roland *et al.*, 1999) y la automatización de un sistema para medir con precisión biomasa en alta mar (Williams & Jenkinson, 1982; Oudot, *et al.*, 1988). Métodos recientes con espectrofotometría para medir el punto final de la titulación parecen ser más confiables alcanzado coeficiente de variación de 0.42% (Maeda-Martinez, 1985; Maeda-Martinez, 2008).

La titulación de Winkler sigue siendo el estándar aceptado para medir oxígeno disuelto (APHA, 1998), a pesar de las afirmaciones en sentido contrario (Czaplewski & Parker, 1973).

Contador Coulter

El *Coulter Counter* fue diseñado para contar y medir los glóbulos rojos y blancos (Coulter, 1953). Posteriormente fue adaptado por Sheldon y Parsons (1967) para contar microalgas. Un contador Coulter es un dispositivo que funciona forzando al fluido a través de un corto y estrecho conducto con una muestra de solución con células o partículas, mientras que la resistencia del canal se mide. Debido a que las células impiden parte del canal, la resistencia aumenta, mientras que la célula se encuentra en el canal. Este cambio transitorio puede utilizarse no sólo para contar las células, sino para calcular su tamaño.

Su función es rápida y precisa y elimina el tiempo del recuento microscópico de células con el hematocitómetro. La desventaja del sistema es que sólo cuenta partículas de un diámetro típicamente $\geq 2 \mu\text{m}$. Puede ser muy inexacto si la muestra contiene muchas partículas o bacterias adicionales.

Fluorescencia

La técnica de la fluorescencia es utilizada para estimar la biomasa microalgal midiendo la clorofila *a* (Honeywill *et al.*, 2002; Berges *et al.*, 1996). La fluorescencia ocurre cuando un electrón de una molécula vuelve a su estado fundamental después de haber estado excitada eléctricamente y emite un fotón en el proceso. Este proceso de emitir un fotón puede ser detectado y medido y es la base de la espectrofotometría de fluorescencia. Fluorescencia es el método más popular para biomonitorio de la biomasa *in situ* en cultivos biológicos (Madrid y Felice, 2005; Hedge, 2006). Este método puede ser útil cuando se requiere conocer una cantidad aproximada de biomasa en cuerpos de agua en estudios tróficos (Matorin *et al.*, 2004).

La intensidad de la fluorescencia es afectada por la cantidad de concentración viable de la biomasa y por algunos factores abióticos tales como burbujas de aire u otros componentes fluorescentes en el medio (Gales, 2000; Madrid & Felice, 2005). Además los dispositivos fluorométricos son costosos y difíciles de incorporar en un biorreactor microalgal automatizado debido a su gran tamaño.

Nefelometría

La nefelometría es un método para la medición de la luz dispersada. En este método, la fuente de luz (generalmente un láser) y el fotodetector son generalmente colocados a 90° uno del otro. El fotodetector detecta la intensidad de la luz dispersada de la muestra. Se basa en el principio de que una suspensión diluida de pequeñas partículas dispersará la luz. La señal obtenida del fotodetector es proporcional a la biomasa. Esta técnica es ampliamente utilizada en laboratorios clínicos porque se automatiza con relativa facilidad (Madrid & Felice, 2005).

Densidad óptica

El principio para medir la densidad óptica (DO) es un método utilizado para cuantificar biomasa microalgal (Madrid & Felice, 2005; Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Se puede explicar con la siguiente fórmula matemática, conocida como la ley de Lambert-Beer:

$$A = \text{Log}_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia medida en la muestra, I es la intensidad de luz después de pasar a través de la muestra y I_0 es la intensidad de luz inicial. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas o biomasa. La ley de la Lambert-Beer se basa en tres puntos: (1) la dirección de la radiación incidente no cambia a través de la muestra; (2) la radiación incidente es monocromática; y (3) el efecto de la dispersión debido a la presencia de partículas sólidas es insignificante comparado a la absorción (Acien Fernandez *et al.*, 1997; Nomura *et al.*, 1997; Okuyama *et al.*, 1998; Gore, 2000).

Una de las ventajas en mediciones basadas en DO es que tiene un cociente de señal/ruido bajo (Wilde & Gibbs, 1998). Por otra parte, la absorción microalgal de una sola longitud de onda puede no ser eficaz para todo el ciclo de crecimiento y para más de una especie.

Bioluminiscencia o quimioluminiscencia de ATP

Bioluminiscencia es la producción y emisión de luz por un organismo vivo, como resultado de una reacción química durante la cual la energía química se convierte en energía luminosa. Su nombre es una palabra híbrida, “bio” de origen griego indica "vivir", mientras “lumen” en el latín indica "luz". Trifosfato de adenosina (ATP) está involucrado en la mayoría de los casos. ATP es generalmente aceptado como un indicador de la viabilidad celular y es también una molécula lo cual almacena energía universal en todos los microorganismos. La técnica se basa en la reacción enzimática que ocurre al enfrentar una solución de ATP y luciferina con la enzima luciferasa que emite luz (bioluminiscencia) cuya intensidad es directamente proporcional al contenido de ATP. Conociendo la cantidad de ATP se conoce la biomasa o la cantidad de microorganismos en la muestra.

La reacción del ATP con sustrato de la proteína luciferina es catalizada por la enzima luciferasa y es el principio de la bioluminiscencia (Billard & DuBow, 1998; Horsburgh *et al.*, 2002; Premkumar *et al.*, 2002; Kim & Gu, 2003). Un fotón de luz se produce por cada molécula de ATP hidrolizado, y esto se puede medir usando un fotómetro (Hobson *et al.*, 1996), dando una sensibilidad de cerca de 10^{-4} mol de ATP (Hedge, 2006). La luz emitida se detecta y es proporcional a la cantidad de ATP en la muestra (Madrid & Felice, 2005). El ATP tiene varias características únicas que la convierten en un indicador fiable de la biomasa microbiana en los ambientes acuáticos. Es omnipresente en todas las células vivas y es generalmente aceptado como un indicador de la viabilidad celular. ATP puede ser extraído con relativa facilidad y ser estabilizado en soluciones con un buffer.

Sus desventajas son que presenta alto costo, que es una técnica bastante inespecífica y sobre todo que la preparación de la muestra es difícil.

Microscopia de Epifluorescencia

Microscopia de epifluorescencia es un método que se basa en principios ópticos de microscopia común y un fluorocromo (un tinte fluorescente utilizado para etiquetar material biológico).

La técnica acertada de esta naturaleza es el método de filtrado de epifluorescencia (Hobson *et al.*, 1996). Usando esta técnica, las microalgas se filtran sobre una membrana apropiada. El agente fluorescente para teñir las células se agrega (por ejemplo, diamidino-2-phenylindole). La detección es realizada por microscopia de fluorescencia o por otros dispositivos capaces de medir epifluorescencia. El límite de detección del método es 5×10^3 microorganismos mL^{-1} (Madrid & Felice, 2005).

Fotoacústica

Una técnica simple basada en mediciones fotoacústicas lo cual permite determinar la biomasa, así como la eficiencia del proceso de la fotosíntesis (Dubinsky *et al.* 1998). El método es rápido, en comparación con otras técnicas, como oxígeno disuelto o en comparación de otros métodos indirectos de medición de fluorescencia.

El método se basa en la conversión de la luz absorbida en calor. Este calor es proporcional a la biomasa al absorber la energía luminosa. Se mide como ola de presión, con un detector fotoacústico sumergido en el cultivo de microalgas.

2.2 MODIFICACIÓN DE LA BIOMASA CON LUZ MONOCROMÁTICA

La luz afecta el crecimiento y la morfogénesis de los organismos autótrofos como las microalgas. La intensidad de luz relativa del sol en el nivel del suelo aparece en la Figura 2. Aunque la gama de longitud de onda de radiación solar es muy amplia, sólo la radiación entre 400 y 700 nm se puede utilizar por las microalgas. Esta parte del espectro solar se llama radiación fotosintéticamente activa o PAR (por sus siglas en inglés) y es la región señalada con las líneas de puntos en la Figura 2.

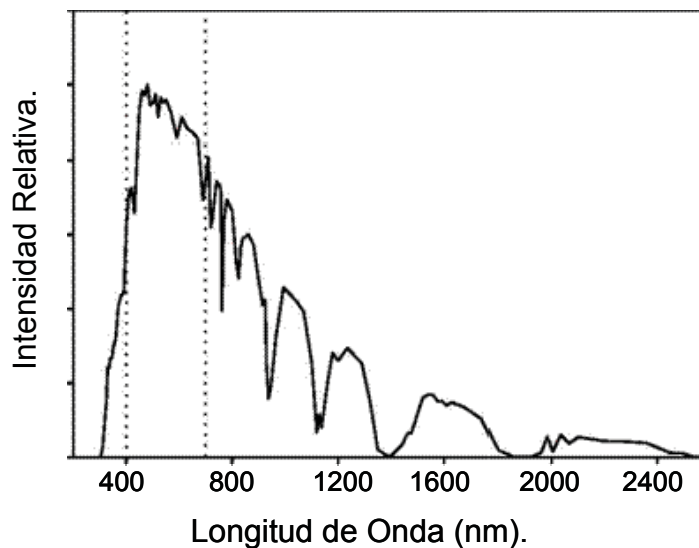


Fig. 2. Intensidad de radiación solar a nivel del suelo. Las líneas punteadas indican la longitud de onda para fotosintetizar (ASTM 2008 American Society for Testing and Materials, ASTM).

En general, es aceptado que la calidad de la luz o longitud de onda necesario para que fotosíntesis proceda en todos los organismos autotróficos debe estar en la rango de PAR (radiación fotosintética activa) de 400 a 700 nm para que sus pigmentos fotosintéticos absorban los fotones (Hall & Rao, 1995; Kirk *et al.*, 1994). Desde el punto de vista de poder cuantificar intensidad de luz en un solo número, es una práctica común sumar todas las contribuciones entre 400 y 700 nm de una fuente de luz.

Los organismos autótrofos utilizan diversas frecuencias de la luz, o colores de luz, para diversos propósitos. Por lo tanto se ha estudiado los procesos de fotosíntesis en detalle principalmente en plantas vasculares (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Gilmore, 1997; Niyogi *et al.*, 1997; Casper-Lindley y Bjorkman, 1998; Masojidek *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001).

Por otro lado, la experimentación con cultivos fotosintéticos en microalgas ha dado lugar a la caracterización de algunas respuestas metabólicas en función a la intensidad de luz con respecto a la producción de pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, ficobiliproteínas (Becker, 2008). De hecho, el conocimiento de respuestas metabólicas y crecimiento de las microalgas ha dado lugar a crear incipientes modelos matemáticos (Fleck-Schneider *et al.*, 2007). No obstante, en las microalgas el conocimiento de la respuesta morfológico y bioquímico con calidad de luz es menor que con plantas vasculares.

Mayoría de los estudios varían solamente la intensidad lumínica

Las poblaciones naturales de microalgas se sujetan continuamente a los cambios en la irradiación en una amplia gama de escalas (Steemann Nielsen & Hansen, 1959; Steemann Nielsen & Jørgensen, 2006). Por lo tanto, las microalgas por adaptación biológica son capaces de responder a las variaciones en la irradiación modificando su fotosíntesis a los cambios de amplitud en la irradiación y la velocidad de estas modificaciones son específicos por especie (Jørgensen, 1964). Desde las primeras investigaciones de las tasas fotosintéticas e irradiación, se mostró que la composición bioquímica (Morris, 1980, 1981; Redalje & Laws, 1983; Terry *et al.*, 1983) y el volumen de las células se modifican con la intensidad de la luz (Prezelin & Sweeney 1978; Falkowski & Owens, 1980; Gallagher & Alberte 1985).

Por lo tanto, la mayoría de trabajos de investigación con microalgas ha implicado variar la intensidad de la luz blanca (espectro completo). Por ejemplo, Kaplan estudió el efecto de la temperatura y de la intensidad de luz sobre el crecimiento en *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) (Kaplan *et al.*, 1986). Abundan estudios similares con intensidad de luz con diversas especies de microalgas (López-Muñoz *et al.*, 1990, López-Muñoz *et al.*, 1992a, López-Muñoz *et al.*, 1992b; Li *et al.*, 2009). De igual manera, se han realizado trabajos estudiando cambios en la composición bioquímica de la microalgas en función a la intensidad de luz (Soeder *et al.*, 1974). También se ha hecho con respecto a variaciones del fotoperíodo (Tzoveni *et al.*, 1997).

Luz monocromática y diodos electroluminosos (LEDs)

La fotomorfogénesis se relaciona con la planta por efectos bioquímicos causados por la luz (Whitelam & K.J. Halliday, 2007). Por ejemplo, se conoce que en plantas ciertas longitudes de onda de luz (luz monocromática) regula un número de rasgos como la germinación de la semilla, la altura de la planta, el área de la hoja, capacidad fotosintética, biomasa, y producción (Borthwick *et al.*, 1952; Briggs *et al.*, 2005). Posteriormente, fue descubierto que la molécula fitocromo era la responsable en las plantas (Briggs & Rice, 1972). En la literatura sólo hay un antecedente que liga la función bioquímica con un

fitocromo en microalgas. El trabajo propone que el fitocromo pueda ser responsable o participar en la producción de etileno en la microalga *Chlorella* (Kreslavsky *et al.*, 1997), aunque nunca se ha identificado o confirmado. En investigaciones con plantas superiores existe una abundancia de datos sobre la fotomorfogénesis y sus fotorreceptores (Briggs *et al.*, 2005; Mathews & Sharrock, 1997).

En microalgas hay diversos trabajos utilizando luz monocromática utilizando filtros de luz azul (Ruyters 1984, Grotjohan *et al.* 1989). El trabajo de You & Barnett (2004) que aplicaron luz monocromática azul y roja en la microalga *Porphyridium cruentum* observando que la luz roja aumentó la producción de azúcares, pero cuando la energía de la luz o intensidad lumínica era demasiado elevado se produjo una disminución de la producción. Dickman *et al.* (2006) reportan y confirman estudios anteriores que la composición bioquímica de la biomasa microalgal puede variar considerablemente en respuesta a la variación en luz y la disponibilidad nutrientes.

Por otro lado, la fuente de luz con diodos electroluminosos (LED) son considerados adecuados para generar luz monocromática y para uso en fotobioreactores. Las luces LED tienen ventajas, tales como alta eficiencia luminosa, bajo consumo de energía, larga vida útil y baja producción de calor en comparación otras fuentes lumínicas. También, los LED tienen longitudes de onda relativamente estrechas, lo que les permite producir una longitud de onda más específica (color), que puede proporcionar beneficios significativos (Koç & Andersen, 2010). Katsuda *et al.* (2006) que estudiaron la producción de la astaxantina en *Haematococcus pluvialis* con LEDs azules. No obstante existe poca investigación estudios con microalgas y LEDs variando la calidad espectral de la luz

Modelo biológico: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) UTEX LB 2307

Se calcula que existen más de 25,000 especies de microalgas pero solamente 15 son aprovechadas tecnológicamente (Raja *et al.*, 2008). La cepa empleada en este estudio fue *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) adquirida en la UTEX Microalgae Collection de la Universidad de Texas (UTEX LB 2307). Es una microalga de color oro-amarillo, desnuda,

unicelular, con dos flagelos. Los pigmentos principales son la clorofila *a*, *c1*, y *c2* (Zapata & Garrido, 1997), siendo la *chl a* la que esta en mayor concentración. (Fig. 3).

Antecedentes indican que existen muchas diferencias en tasas de crecimiento y composiciones bioquímicas en las cepas de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Wikfors & Patterson, 1994). Hay dos cepas de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Parke) y *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO), de la clase Haptophyceae, pero se refieren a menudo en estudios simplemente como *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) a pesar de algunas diferencias (Whyte, 1987).



Fig. 3 Imagen de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Copyright 1995-2009 Protist Information Server).

Isochrysis aff. *galbana* (T-ISO) es una cepa la cual fue aislada cerca de la costa Tahití en el Pacífico Sur en el archipiélago Sociedad por Kenneth Haines en 1977. Mientras *Isochrysis galbana* (Parke) es una cepa la cual fue aislada por Mary Parke en 1938 cerca de la costa de Port Erin en la Isla de Man, en el Mar de Irlanda, entre Inglaterra, Escocia, Irlanda y Gales. Igualmente, la cepa *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) es también referida como *Isochrysis galbana* (T-ISO) o como *Isochrysis affinis galbana* (T-ISO) . El DHA está presente en ambas cepas, pero la clona T-ISO de *Isochrysis galbana* carece EPA. Además, la temperatura óptima del crecimiento de T-ISO es 27.5°C, mientras que para la cepa *Isochrysis galbana* (Parke) es 20°C (Molina *et al.* 1994). Las células de *Isochrysis* *sp.* carecen de pared celular, según confirmado por Zhu *et al.* (1997), y sólo poseen una membrana plasmática. Las células son generalmente solitarias, móviles, 5-6 µm de largo, 2-4 µm de ancho y 2.5-3 µm s de grosor en formas elipsoides (Liu & Lin, 2001). Hay dos flagelos, más o menos iguales, lisos de aproximadamente 7 µm de longitud (Liu & Lin, 2001).

Para la cepa *I. galbana* (Clone Parke) ha sido descrito su ciclo de vida y anatomía (Parke, 1949). Ambas cepas *I. galbana* (clones Parke y T-ISO) son utilizadas para la alimentación de larvas en acuicultura (Walne, 1956; Sánchez *et al.*, 2000).

Actualmente, ninguna de las dos clonas de *Isochrysis* aff. *galbana* (Parke y T-ISO) son empleados en la industria para extraer compuestos bioquímicos en escala comercial, aunque es una especie extensamente utilizada en acuicultura para el uso directo como alimento de larvas de peces y moluscos (De Pauw & Persoone, 1988; Benemann, 1992; Gladue & Maxey, 1994; Borowitzka, 1997). Por lo tanto, y por su alto contenido de lípidos y especialmente de DHA, *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) es de interés comercial de gran escala (Tsovenis *et al.*, 2003).

2.3 PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Medir la biomasa total es importante durante el proceso de cultivo de microalgas. Sin embargo la instrumentación para hacerlo es costoso, laborioso y tardado (Madrid & Felice, 2005). Como resultado el desarrollo industrial de microalgas ha sido limitado, principalmente como alimento especializado en acuicultura y en la industria de alimento saludable (Pulz & Gross, 2004). Por lo tanto, es importante desarrollar tecnologías económicas para medir biomasa para impulsar la industrialización tecnológica de microalgas.

Por otro lado, se conoce que el tipo de luz es un factor importante como disparador ambiental en afectar la calidad de la composición bioquímica de la biomasa microalgal (Falkowski *et al.*, 1980; Kirk, 1983; Raven, 1986; Dubinsky, 1986; Fogg & Thake, 1987; Falkowski & Raven, 1997; Tsovenis *et al.*, 2003). Como resultado, hay una necesidad de identificar posibles disparadores bioquímicos y ambientales en microalgas que pudieron favorecer la acumulación de biomasa y compuestos bioquímicos, como el aceite (Chisti 2007). En otros procesos microbianos industriales como levaduras se conoce que es muy importante la estabilidad de las cepas y los métodos de cultivo utilizados para alcanzar una producción estable (Zhang *et al.*, 1996), pero en microalgas apenas se está examinando rigurosamente (Chisti 2007).

En resumen, factores como la longitud de onda de la luz afectan tanto la calidad como la cantidad de la biomasa microalgal, en función de la proporción relativa de proteínas, carbohidratos y lípidos (Borowitzka, 1988b; Brown *et al.*, 1997; Tonon *et al.*, 2002; Tzovenis *et al.*, 2003). Por lo tanto, no sólo es importante optimizar la cantidad de biomasa microalgal sino también mejorar la calidad ya sea para usos industriales, experimentales y/o como complemento alimenticio.

El presente trabajo se centra en dos líneas de investigación: (1) medir la concentración celular y (2) modificar la biomasa de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) empleando la luz monocromática. Por consecuencia, la estructura de la tesis puede pensarse dividida en dos secciones (Fig. 4).

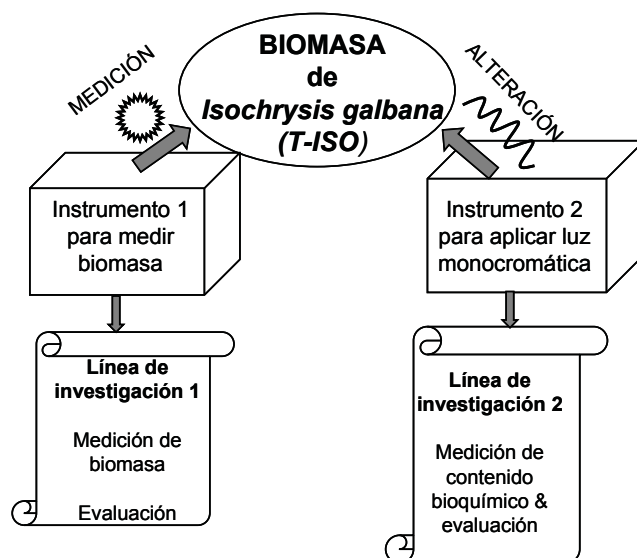


Fig. 4. Diagrama de flujo general del proyecto de investigación.

La primera línea de investigación se centra en medir económicamente la biomasa o células totales, por lo tanto se desarrolló una metodología y se construyó un sistema para procesar imágenes digitales de la luz dispersada en cultivos de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO). Además, se evaluó su eficacia comparándolo con métodos estándares de medición de biomasa. Finalmente, se comparan varios modelos matemáticos para estimar la biomasa utilizando MATLAB.

En la segunda línea de investigación, se aborda modificar la calidad de la biomasa microalgal desarrollando dos sistemas de fotobioreactores (tipo Erlenmeyer), utilizando

como vector luz monocromática incorporando LEDs (diodos de emisor de luz) como fuente lumínica a cultivos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO). Posteriormente, se evaluaron los cambios en números de células y la calidad de biomasa con el objetivo de evaluar su efecto con la luz monocromática.

3.0 JUSTIFICACIÓN

3.1 Uso de la luz para medir la biomasa con imágenes digitales

Por varias décadas diversas metodologías han sido desarrolladas por los ingenieros bioquímicos para cuantificar bioprocesos midiendo variables indirectas tales como pH, temperatura y oxígeno disuelto. Paradójicamente, aunque la concentración de las células (biomasa) es una de las cantidades más importantes de un bioproceso, se mide típicamente fuera de línea. La determinación de la biomasa de microalgas es esencial para usos industriales y experimentales. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema para medir la biomasa es importante para el laboratorio y para la viabilidad comercial, proveyendo el científico o el cultivador información valiosa para optimizar procesos de producción y para reducir los costos de producción (Rusch & Malone, 1998; Gitelson *et al.*, 2000; Sandnes *et al.*, 2006).

El método indirecto más común de valoración de la biomasa hace uso de la densidad óptica (OD) como medida de la turbidez de la biomasa; sin embargo, las desventajas son que requiere una alícuota, curvas de calibración y un espectrofotómetro para su medición (Wilde & Gibbs, 1998; Meireles *et al.*, 2002; Maskow *et al.*, 1999).

El método ideal para estimar la biomasa de microalgas debería ser rápido, exacto, con buena precisión y límite de detección bajo, y utilizar un pequeño volumen de muestra. También se desea que la respuesta sea lineal en la región de medición y sea específica para la microalga de interés en el cultivo. Generalmente, la exactitud absoluta no es necesaria para la valoración de tasas de crecimiento específicas, o para comparaciones de crecimiento, sin embargo es deseable para otros usos. Es también deseable que el sistema de medida sea favorable a la automatización para poder medir cambios en biomasa continuamente o en intervalos temporales cortos, por lo tanto será posible tomar acciones

correctivas apropiadas, especialmente para usos industriales. Aunque todos los métodos individuales se describen, con su precisión y límites, hoy en día no hay un método universal o ideal para medir la biomasa de suspensiones de microalgas.

El proceso de crecimiento de células microalgales se puede estimar mediante la generación de una secuencia de imágenes respecto al tiempo. Se sabe que el color es un indicador útil e intuitivo de la identidad y de la densidad de una suspensión microalgal. Es significativo precisar que históricamente las microalgas fueron clasificadas taxonómicamente por su color (Rowan, 1989). Incluso hoy, en el laboratorio y la industria, las microalgas son determinadas visualmente por el ojo humano para comprobar si las microalgas específicas están creciendo y para generar información cualitativa de la densidad de biomasa.

Para tratar las deficiencias ya mencionadas con técnicas anteriores y error visual humano, este estudio pretende medir biomasa a través de procesamiento de imágenes digitales. La técnica no será destructiva y pretende medir biomasa de una manera rápida, robusta y económica.

3.2 Aplicación de la luz monocromática para modificar la calidad de la biomasa

La luz afecta los procesos de desarrollo de los organismos fotosintéticos, y por consecuencia la calidad de la cosecha. Está claro que la luz no es un substrato simple para las microalgas al igual que la glucosa para la levadura o bacterias, por ejemplo. Dependiendo de la fuente de luz la composición exacta de la luz es diferente y afecta el crecimiento y la morfogénesis de la microalga.

De igual manera, está claro de un siglo de investigación en fotobiología que las plantas poseen redes de fotosensores complicadas que controlan y responden a una amplia gama de energías de luz, sin embargo la mayoría de la producción de biomasa de microalgas todavía utiliza luz con focos incandescentes o tubos fluorescentes (luz blanca). Además de que son escasos los estudios con luz monocromática, la mayoría de estudios con luz varían intensidad.

Este estudio es importante porque aporta, por primera vez, información sobre el efecto de la luz monocromática roja y multicromática blanco con diodos electroluminosos (LEDs) en modificar la calidad y cantidad de la biomasa en *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO). También es significativo este estudio por el desarrollo de instrumentación para poder estudiar en más detalle los efectos de la luz proporcionada con LEDS en las microalgas en general.

4.0 HIPÓTESIS

4.2 HIPÓTESIS 1

Si la concentración celular o biomasa de un cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) está en función directa con la intensidad de color del cultivo, entonces ésta podrá cuantificarse por el procesamiento de imágenes digitales.

HIPÓTESIS 1 ALTERNA

La concentración celular o biomasa de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) no es posible cuantificar por el procesamiento de imágenes digitales porque la intensidad de color está relacionado con otros parámetros físicos y/o biológicos que dificulta extraer la información con precisión.

4.3 HIPÓTESIS 2

Si la longitud de onda de la luz roja monocromática modifica la cantidad y calidad de la biomasa de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) entonces es posible generar biomasa de una calidad definida.

HIPÓTESIS 2 ALTERNA

La longitud de onda de la luz roja monocromática no modifica la cantidad y calidad de la biomasa de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO), lo que sugiere que las células requieran otras longitudes de onda, o que estén operando otros mecanismos.

5.0 OBJETIVOS

5.1 General (Hipótesis 1):

Medir la biomasa a través del procesamiento digital de imágenes utilizando la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) como el modelo biológico.

5.1.1 Particulares (Hipótesis 1):

1. Diseñar y fabricar un sistema económico para efectuar mediciones de biomasa de microalgas, a través de procesamiento de imágenes digitales de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) como organismo modelo.
2. Elaborar la metodología para medir la biomasa de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO).
3. Desarrollar un programa en MATLAB para procesar imágenes digitales.
4. Evaluar el instrumento y la metodología para medir la biomasa de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO).

5.2 General (Hipótesis 2):

Diseñar y construir instrumentación para evaluar el efecto de la luz en la cantidad y calidad de biomasa en *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO).

5.2.1 Particulares (Hipótesis 2):

1. Diseñar y construir un instrumento electrónico (Aparato 2) y software para controlar luz monocromática.
2. Medir el efecto de número y tamaño de células en el crecimiento de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) en función de la luz roja monocromática y luz blanca.
3. Análisis de cantidad y calidad de proteínas, carbohidratos y lípidos totales en la biomasa.
4. Evaluar el efecto de la interacción la luz monocromática en el desarrollo calidad y cantidad de biomasa en la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) .

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA

6.1.1 Cultivo de la microalgas

Para esta parte del estudio de medición de biomasa o concentración de células microalgales, se utilizó la microalga de color amarillo dorado *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) *Tahiti* (T-ISO; UTEX LB 2307) de la Colección de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

La microalga se cultivó en bolsas de plástico de 40 L con agua de mar esterilizada con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975;) con burbujeo continuo de aire (1 vvm). La luz se suministró continuamente con tubos fluorescentes blancos (General Electric Co. Mexico, Mexico) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocados horizontalmente al lado de las bolsas. Temperatura ambiente se controló a 23 ± 2 °C. Cepas de microalgas se prepararon para la generación de curvas de calibración y para la evaluación de la biomasa microalgal.

Para la generación de curvas de calibración 6 L de células de microalgas fueron cosechadas a fines de la fase exponencial (alrededor de 5-6 días). La suspensión se diluyó y se prepararon 700 mL con células de diferentes concentraciones (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%) en 10 diferentes matraces Erlenmeyer de 1-L. La suspensión resultante se utilizó inmediatamente. Para cada una de las suspensiones de microalgas de diferentes concentraciones de células se tomaron imágenes fotográficas. El proceso se repitió tres veces. Las curvas de calibración se utilizaron posteriormente para evaluar el sistema creado para medir biomasa a través de imágenes digitales.

Para evaluar y comparar el método estándar de células con el sistema propuesto, 7 L de células de microalgas fueron cosechadas en la fase exponencial y 12 diferentes muestras

fueron preparadas para evaluar y comparar los resultados. Se prepararon suspensiones para simular densidades de biomasa celular de las tres secciones de la curva de crecimiento normal de las microalgas (la fase lag -de baja densidad celular-), fase exponencial (media densidad celular), y la fase estacionaria (de alta densidad celular). Utilizando la curva de calibración previamente generada se determinaron las densidades de células desconocidas y se compararon los resultados con el sistema estándar de recuento utilizando un contador de partículas Coulter.

6.1.2 Cuantificación de la biomasa de celular

Todas las mediciones de número de células de microalgas se determinaron utilizando un contador electrónico de partículas (Contador Coulter, modelo Z2, de Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, EE.UU.) siguiendo el procedimiento descrito por Sheldon y Parsons (1967).

Se tomó 1 mL de suspensión celular de cada muestra y una dilución 1:20 fue preparado añadiendo 19 mL de solución salina con 10% de formol. Con el contador Coulter se cuantificó el número de células para generar curvas de calibración y para determinar la biomasa de las muestras desconocidas, la cual simulaba la curva de crecimiento.

6.1.3 Sistema de captura de imágenes (Sistema 1)

Para medir la biomasa a través de procesamiento digitales de imágenes se diseñó y se construyó un aparato que consiste esencialmente de una cámara CCD, y una caja oscura (*black box*) (Fig. 5 y 6). El aparato fue construido en los talleres del CIBNOR después de varios ensayos experimentales.

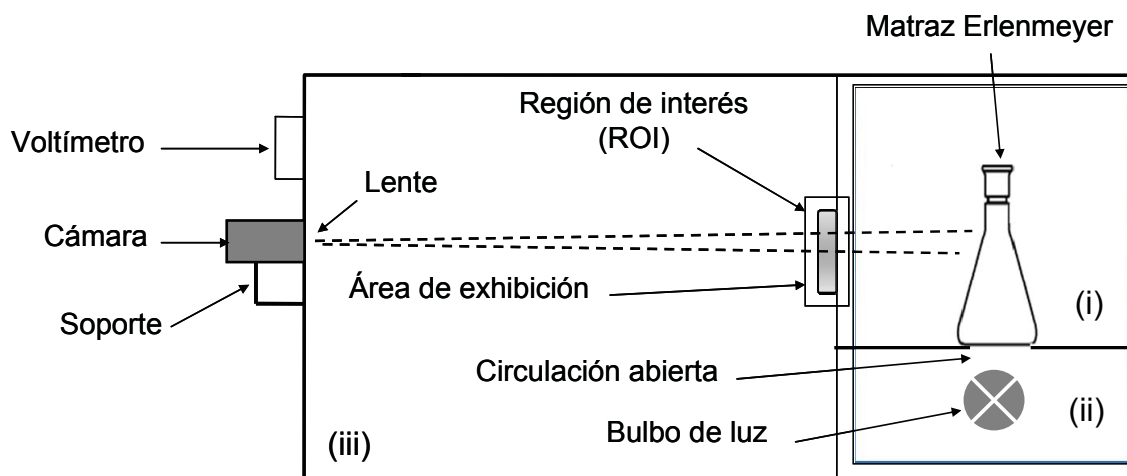


Fig. 5. Diagrama del sistema de instrumentación (aparato 1) propuesto para medir la biomasa que consta de tres secciones interrelacionadas: i) unidad para la muestra, ii) una fuente de luz de cámara y iii) una cámara de los componentes eléctricos

La caja oscura se construyó para ser totalmente impermeable a la luz con aluminio (grado industrial) de 5 mm, de dimensiones exteriores 0.157 x 0.357 x 0.406 m (W x L x H). El interior de la caja de aluminio consiste de tres secciones interrelacionadas: a) unidad para la muestra, b) una fuente de luz y c) una sección para los componentes electrónicos. El interior de las tres secciones de la caja se pintó de negro opaco para evitar reflejos de luz e iluminación no homogénea.

El tamaño de la unidad para la muestra se diseñó para contener un matraz Erlenmeyer de 1-L. Estos matraces varían en tamaño, forma, reflectividad y transparencia, aunque sean del mismo tamaño o volumen dependiendo del fabricante. Por lo que, para que todas las imágenes captadas tuviesen la misma iluminación reflejada se utilizaron matraces Erlenmeyer idénticos de 1 litro provenientes del mismo fabricante (1-L Kimax®, matraz Erlenmeyer, No. 26500, stopper No. 9 (Kimble Glass Inc., Vineland, NJ, EE.UU.). Todas las imágenes de los matraces se colocaron en la misma posición en la caja negra por medio de guías metálicas para asegurar la misma colocación del matraz con cada imagen captada.

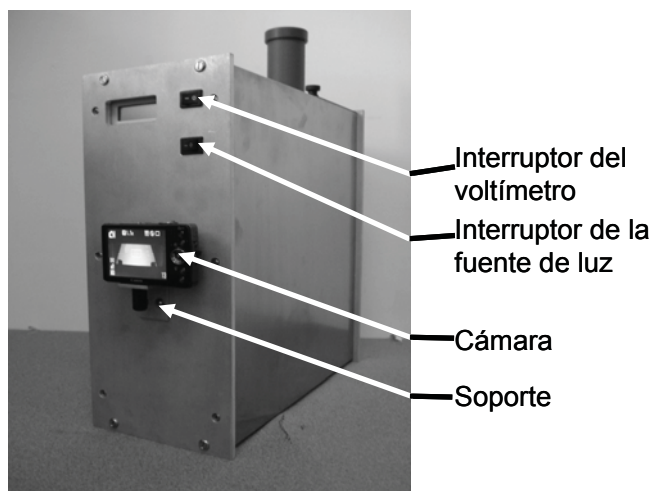


Fig. 6 Fotografía del sistema actual (aparato 1) para realizar medición de biomasa de las microalgas a través de imágenes digitales.

Esencialmente, el aparato consiste de una lámpara de 12 volts, una batería recargable de 12 VCC, un voltímetro y un regulador. El voltímetro mide el voltaje a través del filamento de la lámpara para afirmar que la luz aplicada por el regulador es de un voltaje constante de 10.5 V. Una cámara CCD (Canon SD750 con 35 - 105 mm, lente de zoom Canon, Canon Corporation, Tokio, Japón) fue montada con un soporte externo de la caja y asegurada con tornillo de rosca. Se utilizó una bombilla incandescente (12 VCC, 35 W, de Sylvania, Danvers, MA, EE.UU.) como fuente de luz. En la parte inferior de la unidad se incluyó una abertura circular de 0.082 m para permitir una iluminación uniforme al matraz. Se colocó la luz incandescente a una distancia de 0.015 m del fondo del matraz.

El extremo de la caja incluye una apertura para permitir que la lente de la cámara se introduzca para capturar las imágenes. La distancia del lente al objeto es de 0.23 m, la longitud focal necesaria para enfocar imágenes con esta cámara. Para capturar las imágenes, matraces Erlenmeyer con distintas densidades celulares de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) fueron introducidos individualmente en la caja negra a través de una abertura en la parte superior y se aseguraron con las guías de metal. Previo a su colocación, el frasco se agita suavemente para garantizar una distribución homogénea de las microalgas. La parte superior se cierra y la lámpara de luz se enciende para iluminar el matraz a través de la abertura circular en la parte inferior. La imagen reflejada es vista a

través de una zona de exposición rectangular. La luz reflejada es vista por una área de exposición y la foto es tomada con la cámara colocada a un ángulo de 90° de la fuente de la luz proyectada. Para todas las muestras, antes de tomar las fotografías digitales, se verificó con el voltímetro que el voltaje a través del filamento estaba regulado a un voltaje constante de 10.5V.

El brillo o la intensidad de la luz difusa es reflejado en la etiqueta de color blanco opaco de forma hexagonal que funciona como una pantalla y es proporcional a la biomasa de microalgas. La imagen es capturada con la cámara CCD en un soporte fijo fuera de la caja oscura. El archivo generado de la imagen digital se analizó con un programa escrito en MATLAB. Este proceso se repitió y se capturó todas las imágenes de diferentes densidades de células.

6.1.4 La teoría y la configuración de la cámara

La “fotografía” de un proceso de crecimiento de células de microalgas se puede entender como la generación de una secuencia de imágenes respecto al tiempo. El procesamiento de una imagen digital implica la extracción de información útil de ella (Russ, 1999). Una imagen digital se compone de píxeles que se pueden considerar como pequeños puntos. Pixel es el acrónimo de un elemento de imagen (*picture element*) y es el término que se utiliza más ampliamente para referirse a los distintos puntos de color de una imagen digital. Por consiguiente, una imagen digital de tamaño de m por n, es una instrucción de cómo colorear cada píxel y se compone de píxeles en la dirección vertical (m) y de píxeles en la dirección horizontal (n). Un tamaño típico de una imagen es 512 x 1024 píxeles. En este estudio se decidió utilizar una mayor resolución de 1200 x 1600 píxeles.

Existen diferentes modelos o espacio de color. En el modelo de espacio de color RGB, cada píxel de la imagen RGB sólo puede representar un color compuesto de los tres colores aditivos primarios rojo, verde y azul (RGB). El número de colores que puede representar cada píxel está determinado por el número de bits usados para representar cada elemento RGB. En este estudio, se emplea 8 bits de color para cada color primario (un total

de 32-bits). El objetivo principal del modelo de color RGB es para la captura y visualización de imágenes en sistemas electrónicos, como televisores, monitores y cámaras.

Los otros dos espacios de color utilizados en el análisis de imágenes son matiz, saturación e intensidad (HSI) y matiz, saturación y valor (HSV). El espacio de color HSI es más favorable para el desarrollo de algoritmos (González & Woods, 1992). En este estudio el espacio de color RGB de 32 bits de profundidad de color (8-bits de color para cada color primario) se emplea para capturar las imágenes y el espacio de color HSI se utiliza para el tratamiento de las imágenes digitales.

La luminosidad de un píxel es la cantidad de brillo de un píxel (intensidad). Cuando crece una suspensión de microalgas aumenta el número de microalgas y también aumenta la intensidad del color. El espacio de color HSI se pueden conceptualizar en tres dimensiones, dos dimensiones de color y la tercera dimensión o vector sólo incluyendo intensidad luminosa. Esta relación es particularmente útil porque significa que para una microalga específica de un color determinado sólo cambia la intensidad, mientras que el color sigue siendo el mismo aunque aumenta la densidad. Al aislar la luminosidad o intensidad de HSI es posible cuantificar la biomasa. En el espacio de color RGB la intensidad no es lineal. Por lo tanto, se capturan las imágenes en espacio de color RGB (32 bits). Posteriormente, estas imágenes se convirtieron al espacio de color HSI y 8 bits en escala de grises para extraer nada más la intensidad luminosa.

Para la cámara seleccionada, píxeles del CCD consistiendo de varios sitios activos o foto píxeles registran la cantidad de luz de los tres colores diferentes: rojo, verde y azul (RGB). El número de electrones producido es proporcional a la cantidad de luz recibida. Cada píxel sólo puede detectar un color, rojo, verde o azul.

Para producir una imagen RGB la cámara lleva a cabo como mínimo dos medidas. Primero, la cámara procesa las imágenes e interpola los colores de los sitios activos vecinos del CCD para calcular un color para cada píxel. Segundo, los valores RGB se corrigen a la temperatura de color de la luz, este proceso es también conocido como balance de blancos.

Después de varias pruebas para determinar el punto óptimo así como la repetibilidad de las imágenes, los parámetros de la cámara fueron fijados a los valores presentados en la Tabla I. Se seleccionó un valor de ISO de 800 para aumentar la sensibilidad a la luz, lo

cual incrementa el rango dinámico aún cuando se introduzca un poco de ruido aleatorio por fotones.

Tabla I. Parámetros seleccionados de la cámara CCD para capturar las imágenes.

Parámetro	Configuración
MODE	Manual
ISO	800
EXP	0
TYPE	EVAL
DIGITAL ZOOM	1.5X
ISO SHIFT	OFF
AWB	Automatic

6.1.5 Procesamiento digital de imágenes

Para cuantificar la biomasa de microalgas así como el análisis de imágenes digitales se escribió un programa en MATLAB ver. 7.0 (The MathWorks, Inc., Natick, MA, EE.UU.). El programa convierte imágenes de color a escala de grises. Se evaluaron tres algoritmos diferentes de luminosidad para calcular biomasa. Para estos algoritmos, el programa escrito segmentó la imagen de cada matraz con diferentes densidades celulares a una región rectangular de interés (ROI) de 114 filas y 57 de columnas –un total de 6498 píxeles de RGB (Fig. 7).

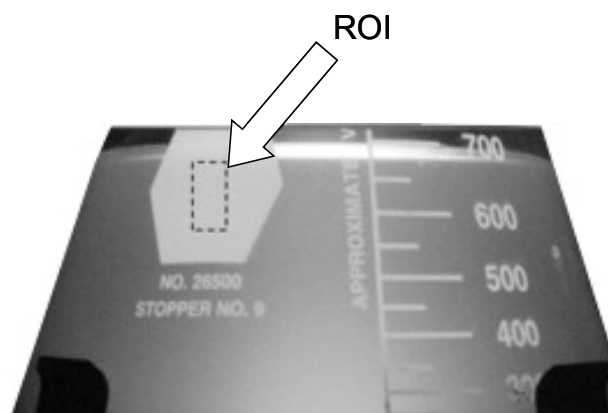


Fig. 7. Región de Interés (ROI) es el área para obtener valores de RGB y convertirlo a escalas de grises y obtener la densidad celular o biomasa. Consiste de 6,498 píxeles (114 columnas x 57 filas).

Los valores RGB de la ROI fueron procesados y el ruido se filtro obteniendo un promedio. Para disminuir variabilidad lumínica fue esencial utilizar el mismo rectángulo de ROI. Para eliminar y minimizar errores humanos el enfoque de la cámara se fijó a operación automática. Sin embargo durante la experimentación, se encontró una gran variabilidad de resultados porque la cámara enfocaba a veces atrás y a veces adelante del matraz. Esta variabilidad fue superada utilizando la etiqueta del matraz Erlenmeyer, lo cual es blanco opaco y funciona como una pantalla proyectando la concentración microalgal. Esta pantalla permite que la cámara siempre se enfoque en la parte delantera del matraz, independientemente de la concentración de la muestra.

A continuación se muestra el diagrama de flujo del programa de software (Fig. 8). La subrutina “Delay” del diagrama de flujo del programa de software de MATLAB muestra cómo funcionaría el programa para biomonitorio continuo. Captura fotografías de un cultivo de microalgas a intervalos regulares de tiempo. El proceso experimental se repitió tres veces para obtener un promedio.

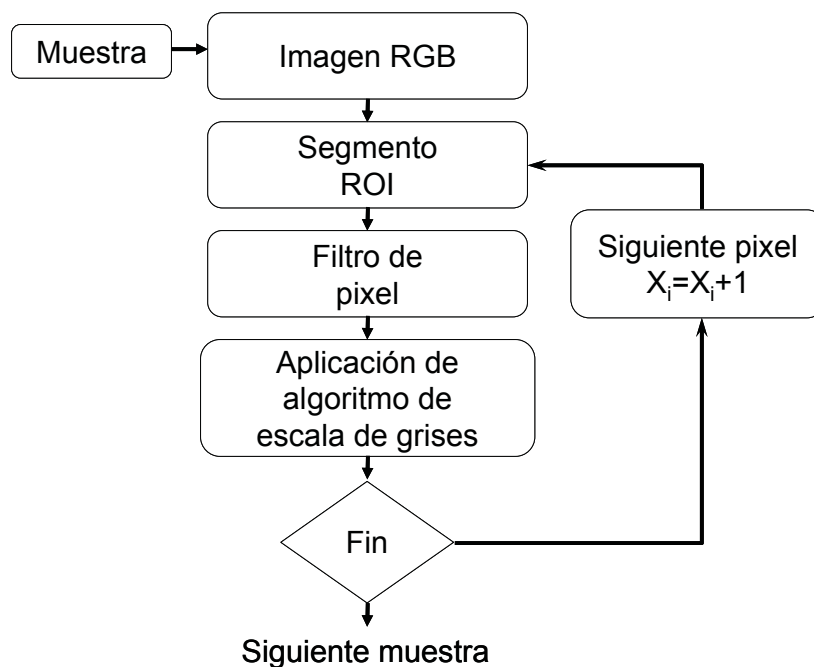


Fig. 8. Diagrama de flujo para calcular tonos de grises de las imágenes digitales. La subrutina “Apply Algorithms” incluye algoritmos para las modelos estándar de tonos de gris (GS1, GS2) e igual que un algoritmo para el modelo propuesto (M1), lo cual optimiza el rango dinámico para el color específico de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO).

El primer algoritmo (GS1) evaluado, calcula la luminosidad utilizando de MATLAB la función `rgb2gray` que convierte las imágenes de color RGB a valores de escala de grises (luminosidad). El algoritmo genera una suma ponderada de los componentes de color rojo, verde y azul (R, G, y B) como se indica en Eq. 2:

$$GS1 = K_R R + K_G G + K_B B \quad (2)$$

Los valores del coeficiente RGB que utiliza el programa son: $K_R = 0.2989$, $K_G = 0.5870$ and $K_B = 0.1140$. La función `rgb2gray` convierte las imágenes RGB a escala de grises con valores entre 0 y 255, eliminando el tono y la saturación, manteniendo sólo información de la luminancia.

Luminancia es el grado de brillo o luminosidad y es directamente proporcional a la biomasa de microalgas. En MATLAB existen dos maneras de representar el número que representa el brillo o la intensidad de un pixel. Una manera es la que asigna un número entre 0 y 1 para cada píxel. Valor 0 corresponde al negro y el valor 1 corresponde al blanco. La otra forma se llama `uint8` que asigna un número entero entre 0 y 255 representa a la intensidad en una escala de tonos de grises.

Para este estudio se utilizó la clase `uint8` para procesar las imágenes. En esta escala, el valor 0 corresponde al negro y el valor de 255 corresponde al blanco. Esto permite una mejor resolución teórica de $1/255$ o 0.39 % sin tomar en cuenta errores asociados con la de la variabilidad de la medición real.

El segundo algoritmo (GS2) utilizado para evaluar la biomasa como una función de la luminosidad, es similar a la primera, pero en este caso los coeficientes RGB. K_R , K_G y K_B son iguales a 0.333 (Gonzalez & Woods, 1992). Este algoritmo (Eq. 3) extrae información de la luminosidad del espacio de color RGB o intensidad de espacio de color HSI.

$$GS2 = 0.333R + 0.333G + 0.333B \quad (3)$$

Las constantes de K_R , K_G y K_B se ponderan para permitir el contraste de tonos grises de imágenes de múltiples colores. Por lo tanto, el resultado de la imagen en blanco y negro es perceptible para el ojo humano. Para obtener una imagen de blanco y negro es

importante distinguir entre los tonos de gris, pero no para esta aplicación, ya que sólo hay un color de interés, el de color amarillo dorado de *I. aff. galbana* (T-ISO).

La conversión a escala de grises de una fotografía digital con amarillo genera un color más claro en los dos algoritmos GS1 y GS2. Por lo tanto, fotografías convertidas a escala de grises con estos dos algoritmos convierten el amarillo a un tono más blanco que los demás colores.

Esto causa que el rango dinámico sea menor. Para superar esta complicación se desarrolló otro algoritmo modificado de luminosidad (M1), el cual cambia los coeficientes de RGB (K_R , K_G y K_B). Los coeficientes modificados generan una curva de escala de grises específica para el color de la microalga, como se muestra en Eqs. 4, 5 y 6.

$$K_R = M_R / (M_R + M_G + M_B) \quad (4)$$

$$K_G = M_G / (M_R + M_G + M_B) \quad (5)$$

$$K_B = M_B / (M_R + M_G + M_B) \quad (6)$$

Donde M_R , M_G y M_B son las pendientes lineales de los colores rojo, verde y azul en la escala RGB, respectivamente (Fig. 9).

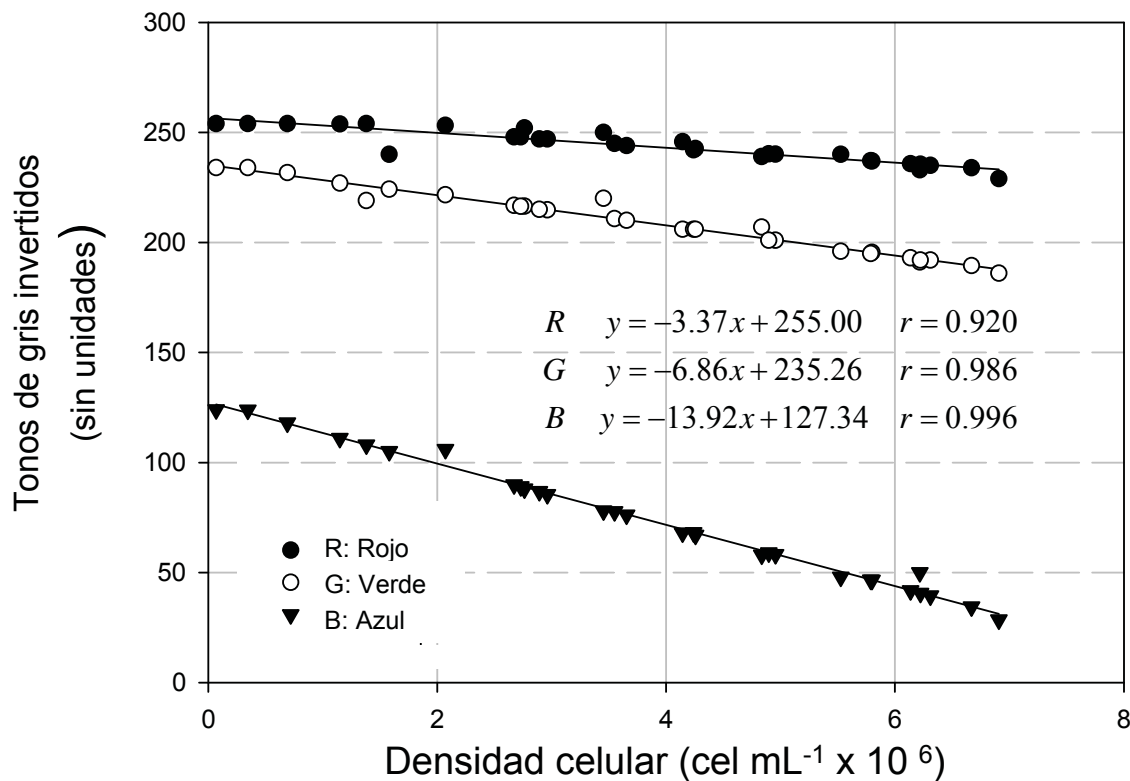


Fig. 9. Análisis de regresión entre los valores de color de RGB (rojo, verde y azul) y el número de células por mililitro.

A continuación, el algoritmo resultante (M1) con un mejor rango dinámico es el siguiente:

$$M1 = K_R(255 - R) + K_G(255 - G) + K_B(255 - B) \quad (7)$$

Los valores calculados de las pendientes específico para esta microalga son: $M_R = -3.37$, $M_G = -6.86$ y $M_B = -13.92$, y el RGB coeficientes son los siguientes: $K_R = 0.139$, $K_G = 0.284$ y $K_B = 0.576$.

Este nuevo algoritmo (Eq. 6) mejora el rango dinámico de esta aplicación porque es específica para medir la biomasa de *I. galbana* (T-ISO). La base física de esto es que las constantes de K_R , K_G and K_B son ahora ponderados en favor del color azul, que para nuestra microalga de color amarillo, cambia más en la escala de RGB que en los colores rojo o verde.

Además de cambiar las constantes, en Eq. 6 se invirtió la escala restando el valor máximo de 255 de cada color primario. El resultado es aún una escala de 0-255 como la escala de grises, pero ahora es directamente proporcional a la transmitancia de la luz difusa, y ahora un valor alto indicará más biomasa. El efecto es de generar una curva que aumenta en función al incremento de la biomasa o densidad celular.

6.1.6 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante análisis de correlación en MATLAB. Se calculó para todos los modelos los coeficientes de correlación (r) y se elaboraron curvas de calibración entre los niveles de RGB, escala de grises (GS1 y GS2) y el algoritmo propuesto (M1) con los datos de densidad celular de *I. galbana* (T-ISO). Se calcularon ecuaciones lineales derivadas de las curvas de calibración GS1, GS2 y M1, los cuales se utilizaron para determinar densidad celular desconocido de *I. galbana* (T-ISO). Las diferencias porcentuales entre el sistema propuesto y el método estándar de conteo de células utilizando un contador Coulter.

6.2 SISTEMA DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDs)

Se construyeron dos sistemas de producción de microalgas con luz monocromática utilizando diodos electroluminosos (LEDs). Ambos sistemas empleaban LEDs (rojos y blancos) y frascos Erlenmeyer de 1-L. sistema “A” empleaba LEDs colocados para iluminar el cultivo desde arriba mientras sistema “B” iluminaba el cultivo desde abajo desde la base del matraz.

6.2.1 Sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática

El sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática consta de 6 compartimentos impermeables a la luz para crecer microalgas en matraces de Erlenmeyer de 1 L. Cada compartimento de 17x17x17 cm es aislado individualmente de la luz de los demás (Fig. 10).

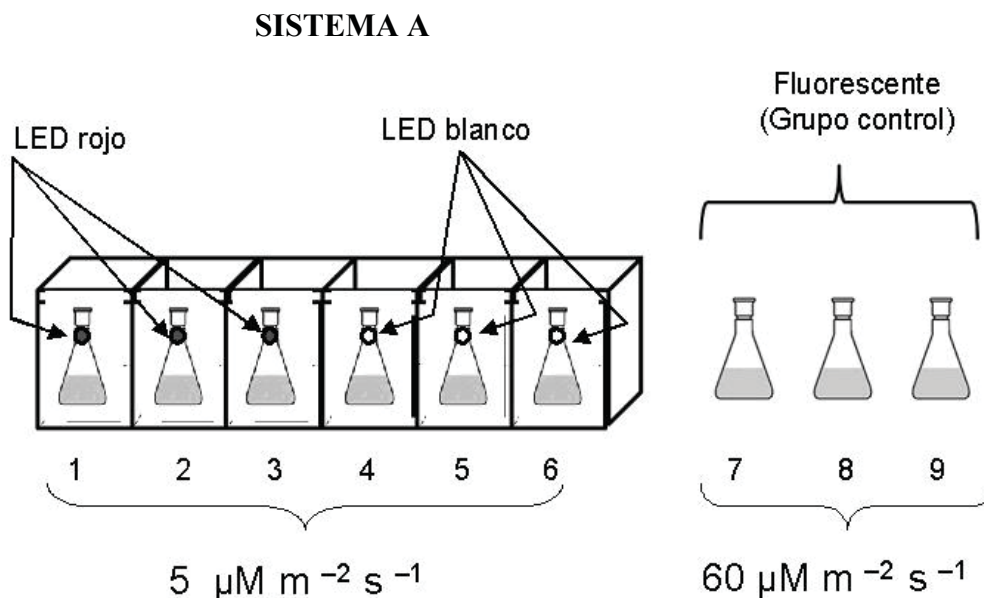
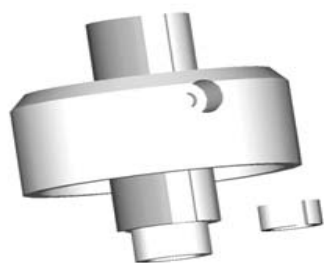


Fig. 10. Diagrama del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los 6 cajas negras (3 LED rojos y 3 LED blancos). La luz generada de los LEDs se aplica de un tapón especialmente diseñado para sujetar el LED. En los matraces 7, 8 y 9 (control) se utiliza luz de un tubo fluorescente blanco (General Electric Co. Mexico, Mexico) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocado horizontalmente al lado (no mostrado en diagrama).

En el sistema “A” los LEDs están colocados en un tapón de plástico especialmente fabricado para sujetar los LEDs (Fig. 11). Los LEDs utilizados eran de alta intensidad (5,000 millicandelas). La irradiancia se midió con un irradiómetro Sper Scientific Ltd modelo 840022 a $\sim 5 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el fondo del matraz.



(A)



(B)

Fig. 11 Elementos del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática. Diagrama de (A) tapón especialmente diseñado para sostener LEDs para matraces Erlenmeyer de 1-Litro y (B) detalle fotográfico de un matraz de 1-L con el tapón y LED rojo encendido donde se aprecia el ángulo estrecho de luz la cual genera el LED. El tapón de plástico para sujetar LEDs fue diseñado y elaborado en el taller de maquinados del CIBNOR.

En la Fig. 12 se muestra el sistema “A” de producción de microalgas con LEDs y en Fig. 13 se aprecia el panel de control de sistema “A”.



Fig. 12 Detalle fotográfico del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los LEDs rojos y blancos encendidos.

Regulador voltaje AC a DC

PIC16F84A

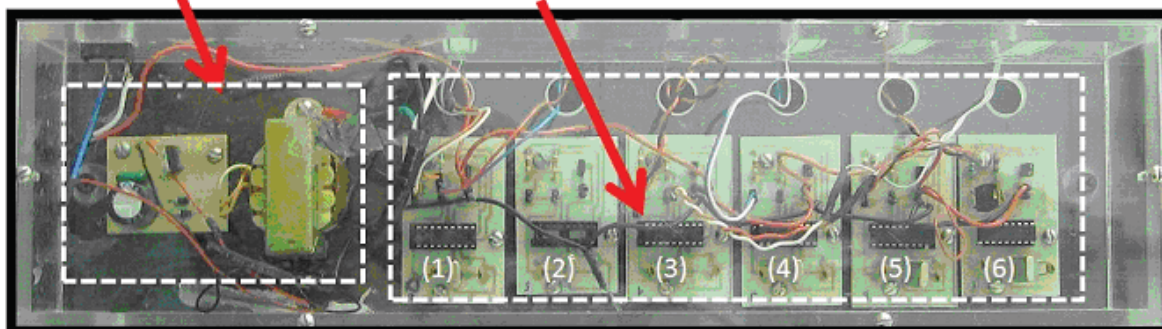


Fig. 13 Detalle fotográfico del panel de control del sistema “A” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestran los 6 microcontroladores PIC16F84A y el regulador de voltaje AC a DC.

6.2.2 Sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática

El sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática consta de 6 bases con LEDs impermeables a la luz para crecer microalgas en matraces de Erlenmeyer de 1 L (Fig. 14). Cada base es circular y construido de PVC y mide 3.5 cm de altura, 11.5 cm de diámetro exterior y 10.2 cm de diámetro inferior. El propósito de la base es sostener el matraz e iluminar las microalgas a una irradiancia lumínica mayor que el sistema “A”.

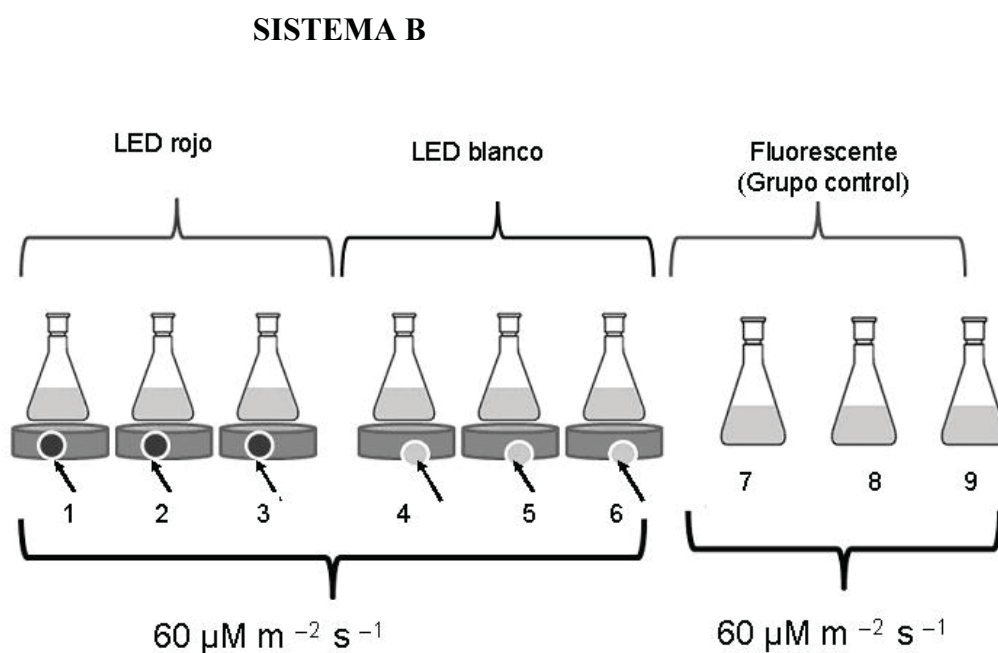


Fig. 14. Diagrama del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra los 3 LEDs rojos y 3 LEDs blancos (1 a 6). La luz generada de los LEDs se aplica desde la base la cual genera una intensidad luz más elevada que sistema “A”. En los matraces 7, 8 y 9 (control) se utiliza luz de un tubo fluorescente blanco (General Electric Co. México, México) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocado horizontalmente al lado (no mostrado en diagrama). Las flechas indican donde están localizados los LED, cerca de la base del matríz.

Adentro de la cada esta formado de tres elementos: (1) LED, (2) espejo parabólico y (3) lente (Fig 15). El propósito del espejo y el lente es dispersar la luz monocromática para que la irradiancia lumínica sea más homogénea y uniforme adentro del matraz con el cultivo.

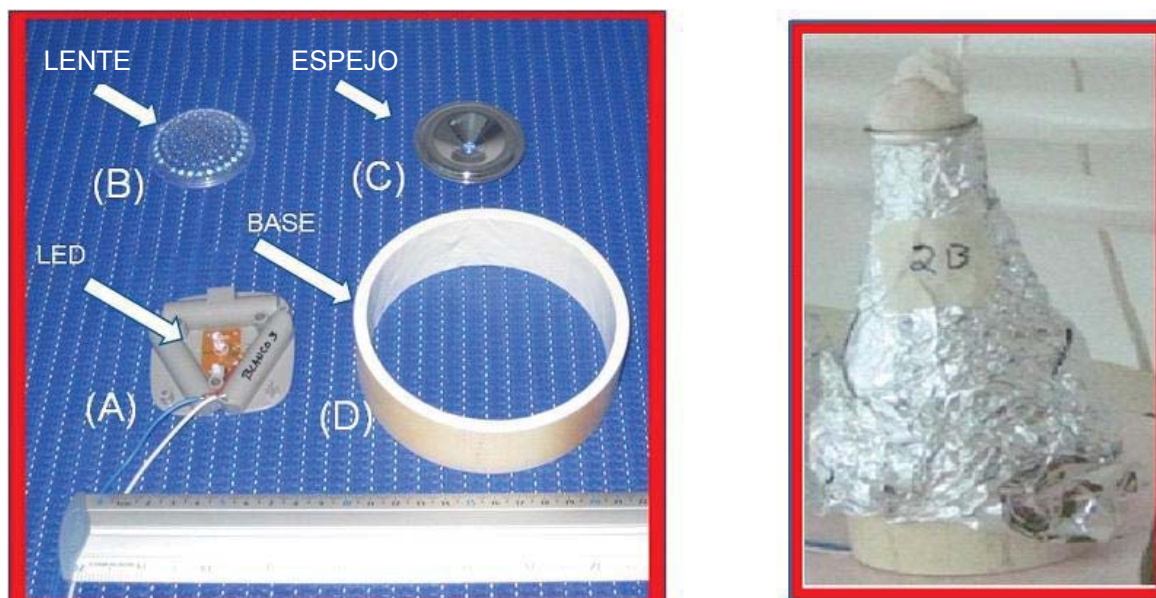


Fig. 15. Detalle fotográfico de los elementos del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra en la fotografía izquierda: (A) LED, (B) LENTE, (C) ESPEJO parabólica y (D) BASE; a la derecha se muestra un matraz en su base protegido de la luz externa con papel aluminio.

En la Fig. 16(A) se muestra el sistema “B” de producción de microalgas con LEDs y en Fig. 16(B) el sistema “B” con matraces y microalgas incluyendo el grupo control.

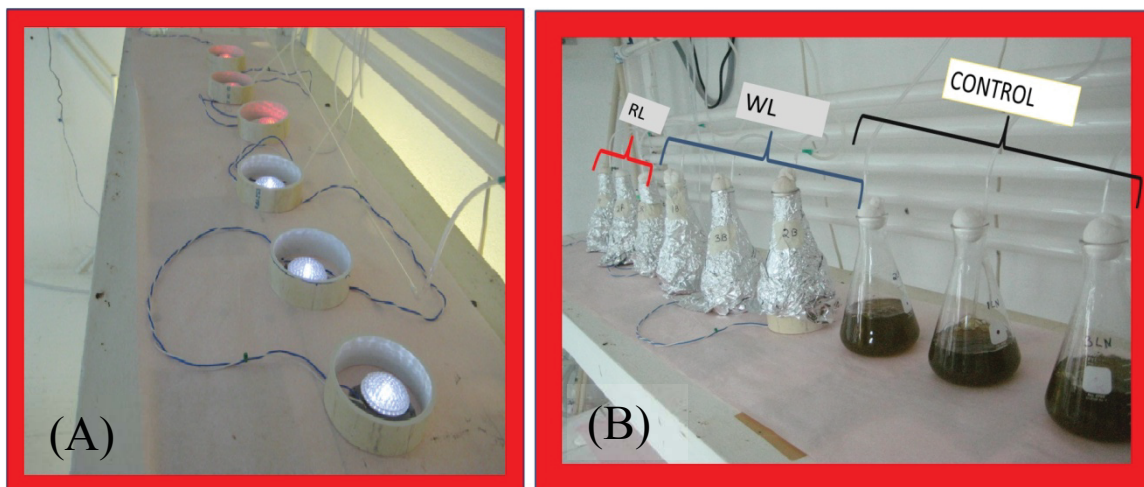


Fig. 16. Detalle fotográfico de los elementos del sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática donde se muestra: (A) el sistema con los LEDs rojos y blancos encendidos; y, (B) el sistema con los matraces en sus bases protegidos de luz externa con papel aluminio (RL= LED rojo, WL = LED blanco).

Fig. 17 se muestra el detalle fotográfico del controlador de tiempo utilizado para controlar el fotoperiodo de sistema “B”.



Fig. 17 Detalle fotográfico del controlador de tiempo en el sistema sistema “B” de producción de microalgas con luz monocromática

6.2.3 Fuentes lumínicas

Para la luz roja se utilizó LEDs de GaAlAs rojo (frecuencia máxima de 660nm con intensidad de 5000 mcd) y LED blanco de 5000 mcd. Para iluminar el grupo control se utilizó un foco de luz fluorescente de 40W y se colocó horizontalmente al lado de las matraces a una distancia de intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para el sistema “A” los LEDs suministraban una intensidad lumínica de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mientras los LEDs de sistema “B” proveían intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.2.4 Preparación del inóculo

Para esta parte del estudio se cultivó *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) Tahiti en 2 matraces de 2 L en cultivo batch con agua de mar esterilizada con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975;) y con burbujeo continuo de aire (1 vvm). La luz se suministró continuamente con tubos fluorescentes blancos (General Electric Co. Mexico, Mexico) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ colocados horizontalmente al lado de las matraces. La temperatura ambiente se controló a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Se sembraba el cultivo cada 3 días por una semana para sincronizar el ciclo y el tamaño celular posterior para utilizarlo como inóculo en los experimentos de luz. Para cada experimento con luz se cosechaba 2L de microalgas sincronizados al 4 día y se inoculaban 9 matraces con 200 mL de *I. galbana* (T-ISO) y 500 mL con medio f/2. Estos cultivos preparados para los experimentos con luz partieron de inóculos de aproximadamente 2 a 3 millones de cel mL^{-1} .

6.2.5 Experimentos

Para cada bioensayo se prepararon 9 matraces Erlenmeyer de 1 L estériles con 700 mL de cultivo de acuerdo a sección 6.2.3. De estos seis matraces se destinaban tres para sistema “A” o “B” y tres matraces por luz fluorescente (control). Se llevaron a cabo en total 4 bioensayos con luz. Dos bioensayos de luz monocromática con sistema “A” y dos con

sistema “B” con diferente iluminación pero con fotoperiodo invariable (Tabla II). Cada bioensayo de luz se realizó en triplicado y duraba 5 días.

La medición de las concentraciones de células de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) en los 9 matraces antes y después del experimento se llevó a cabo en el Coulter Counter de Beckman (modelo ZM, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE.UU). Se colocaron los 6 matraces en su compartimiento individuales y 3 matraces de control y se aplicaron diferentes calidades y cantidades de luz por 5 días.

Tabla II. Tipo de luz y fotoperiodo seleccionado en cada matraz para cada bioensayo.

Matraz	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tipo de luz	Roja 12h:12h	Roja 12h:12h	Roja 12h:12h	Blanca 12h:12h	Blanca 12h:12h	Blanca 12h:12h	FL 12h:12h	FL 12h:12h	FL 12h:12h

* FL - Luz Fluorescente (grupo control)

Durante los bioensayos de luz se obtuvo burbujeo constante en cada matraz con aire forzado a ~1 vvm.

6.2.6 Determinación de la tasa de crecimiento poblacional

La tasa de crecimiento de la microalga *I. galbana* (T-ISO) se calculó utilizando la ecuación:

$$\mu_e = \frac{\ln \left(\frac{N2}{N1} \right)}{t2 - t1} \quad (8)$$

donde μ_e = tasa de crecimiento poblacional, **N1** y **N2** son el número de células mL⁻¹ en el tiempo **t1** y **t2**, respectivamente.

6.2.7 Determinación de las duplicaciones diarias en la tasa de crecimiento poblacional

La mayoría de microalgas se reproducen mediante división binaria. Por consecuencia, la tasa de crecimiento se puede representar en número de divisiones celulares o duplicaciones diarias de biomasa mediante la ecuación:

$$\mu_2 = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right) / \ln 2}{t_2 - t_1} \quad (9)$$

donde μ_2 = tasa de duplicaciones diarias en la poblacional, N_1 y N_2 son el número de células mL^{-1} en el tiempo t_1 y t_2 , respectivamente.

6.2.8 Determinación de tiempo de duplicación poblacional

La tasa de tiempo de duplicación expresado en días t_g de la microalga *I. galbana* (T-ISO) se calculó utilizando la ecuación:

$$t_g = \frac{1}{\mu_2} \quad (10)$$

donde μ_2 = duplicaciones diarias en la poblacional calculado de la ecuación 9 (Sección 6.2.7).

6.2.9 Análisis de peso seco de *I. aff. galbana* (T-ISO)

Para la determinación de peso seco se utilizó el método descrito por Arredondo-Vega & Voltolina (2007). Para todas las muestras se tomó una alícuota conocida de 25-27 mL de la suspensión al terminar la experimentación con luz. La alícuota fue filtrada en papel filtro (Whatman GF/C 47 mm) previamente pesado y secado en una estufa a temperatura entre 65 y 70°C por 24 horas. Posteriormente se colocó en un desecador por 1 hora y se pesó a una resolución de 4 decimales. Se repitió el proceso de secar y de pesar 3 veces o hasta determinar que el peso quedaba constante, estable y por lo tanto sin humedad.

6.2.10 Contenido bioquímico de la biomasa de *I. aff. galbana* (T-ISO)

El contenido bioquímico (lípidos, proteínas y carbohidratos totales) se determinó al terminar cada bioensayo de luz al cinco día por triplicado. Concentración de 500 mL de microalgas cosechadas de cada reactor fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 10°C en una centrífuga refrigerada marca BECKMAN GPR modelo CS-6R en tubos cónicos. El centrifugado se decantó y la pastilla celular se lavó con 15 mL de formato de amonio al 5% para eliminar las sales. El procedimiento de centrifugar y decantar se repitió hasta obtener toda la biomasa de cada ensayo en un tubo cónico de 50 mL. Posteriormente, los tubos cónicos fueron guardados en un ultracongelador marca Continental Freezer a -80°C, dentro de un frasco Pyrex para liofilización. Las muestras se secaron en un liofilizador Virtis 5L en varias sesiones hasta alcanzar las 24 horas para cada muestra. Finalmente, para las determinaciones de contenido bioquímico, las muestras liofilizadas fueron primeramente transferidas en tubos eppendorf previamente pesados y etiquetados.

Cuantificación de lípidos totales

La determinación de lípidos se realizó utilizando el método de Bligh y Dyer (1959). El principio de la técnica está en que los lípidos totales se extraen con una mezcla de cloroformo/metanol/agua. Para dicha determinación se pesó 5 a 20 mg de la muestra liofilizada de cada experimento y se colocó en tubos de ensayo individuales. Se agregaron 3 mL de cloroformo/metanol/agua (1:2, 0.5) y 5 µL de antioxidante BHT y se sonicó, posteriormente se incubó 24 h a 4 °C protegido de la luz. Después se agregó 2 mL de cloroformo y 3 mL de agua, se mezcló con vortex y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min a 10°C. La parte inferior (cloroformo) se separó y colocó en un tubo de ensayo previamente pesado y se secó con nitrógeno gaseoso. Luego se agregó 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y se selló los tubos de ensayo con papel aluminio y un tapón con rosca. Esta mezcla se quemó a temperatura de 200°C por 15 minutos. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente y se colocó los tubos de ensayos en un baño con hielo, se agregó 3 mL de agua destilada a cada tubo y se mezcló con un vortex hasta que toda la

muestra quedo homogénea y sin residuos de materia orgánica. Para la curva de calibración se construyó una curva patrón de 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 de μg de lípidos utilizando triplamitina como estándar. La absorbancia se lee a 375 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic Genesys 20. Para obtener los lípidos totales por unidad de peso seco de la microalga se utilizó la relación:

$$\% \text{ Lípidos} = [(A_{375 \text{ nm}}/m \times V) / P] \times 100 \quad (11)$$

donde:

$A_{375 \text{ nm}}$ = Absorbancia

m = pendiente o factor de corrección de la curva de calibración

V = Volumen del extracto (en mL)

P = Peso seco biomasa liofilizada (mg)

Cuantificación de proteínas totales

La determinación se realizó mediante la técnica de Lowry *et al* (1951). El principio de esta técnica se basa en la reacción oxidante de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico: FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre, resultando en un color azul cuya intensidad depende del contenido. Se peso 5 mg de muestra liofilizada y se colocó en tubos de ensayo. Se agregó 5 mL de NaOH 0.1N para hidrolizar las proteínas y se hizo reaccionar en un termo-baño marca Techne TE-8J a 100 °C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min a 10°C. Se separó el extracto con pipeta Pasteur. Se prepararon dos soluciones: (1) Na_2CO_3 al 2% (p/v) en NaOH 0.1N (solución A) y (2) CuSO_4 al 0.5% en tartrato de K al 1% y agitar (solución B). A la muestra (extracto alcalino) se agregó 5 mL de solución A y B en una proporción 50:1. Posteriormente se agregó a la mezcla 500 μL de la solución 1:1 de Folin: H_2O destilada y se agitó en vortex y se dejó reposar en la oscuridad por 40 minutos. La curva de calibración se elaboró a partir de una solución estándar de albúmina bovina (BSA) con un rango de concentración de 0 – 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0, 30, 60, 90, 120 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se midió la absorbancia del extracto a 750 nm en un

espectrofotómetro marca Thermo Spectronic Genesys 20. Para obtener la concentración de proteínas por unidad de peso seco de la microalga se utilizó la relación:

$$\% \text{ Proteínas} = [[(m \times A_{750 \text{ nm}}) / V_m] \times V_g] / P \times 100 \quad (12)$$

donde:

$A_{750 \text{ nm}}$ = absorbancia

m = pendiente de la curva de calibración

V_m = Volumen de la muestra

V_g = Volumen del extracto alcalino (5 mL)

P = peso seco biomasa liofilizada (mg)

Cuantificación de carbohidratos totales

Para la determinación de carbohidratos se utilizó el método de Dubois, *et al.* (1956). El fundamento de éste método se basa en hidrolizar los enlaces glucosídicos que forman los polisacáridos y disacáridos para ser convertidos a monosacáridos. Los complejos variarán en color de verde a negro, dependiendo de la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra. Se peso 5 mg de muestra liofilizada y se colocó en tubos de ensayo. Se agregó 4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.0 N y se y se sonificó por 5 min. Se agregó otros 4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.0 N y se selló los tubos de ensayo con papel aluminio y un tapón con rosca. Se hizo la colocó las muestrs en un termo-baño marca Techne TE-8J a 100 °C durante 1 hr. Se retiro las muestras en los tubos de ensayo y se dejo enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugo a 3,000 rpm durante 15 min a 10°C y posteriormente se separo el extracto acido con pipeta Pasteur. Se tomo del extracto ácido 1 mL y se agrego 1 mL de fenol 5% y se mezclo con vortex. Se agragó a mezcla lentamente 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado en una campana de extracción y se enfrio a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia del extracto a 485 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic Genesys 20. Los resultados se compararon contra una curva calibraciónde absorbancia preparada con 0, 24, 48, 72, 96, 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de una solución estándar de glucosa de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para obtener los carbohidratos totales por unidad de peso seco de *I. aff. galbana* (T-ISO) se utilizó la relación:

$$\% \text{ Carbohidratos} = [[(m \times A_{485 \text{ nm}}) / V_m] \times V_g] / P \times 100 \quad (13)$$

donde:

$A_{485 \text{ nm}}$ = absorbancia

m = pendiente de la curva de calibración

V_m = Volumen de la muestra

V_g = Volumen del extracto alcalino (5 mL)

P = peso seco de biomasa liofilizada (mg)

6.2.11 Análisis estadístico

Para determinar si los diferentes tratamientos tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la microalga, se realizó un análisis de variancia de un solo factor, examinado los valores medios de los diversos tratamientos. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS 11.5.

7.0 RESULTADOS

7.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA

7.1.1 Generación de la curvas de calibración

En la Figura 18 se muestran las curvas de escala de grises con el método utilizado por el software MATLAB, y la escala de grises indicado por González & Woods (1992) y los coeficientes de correlación fueron 0.992 y 0.995, respectivamente.

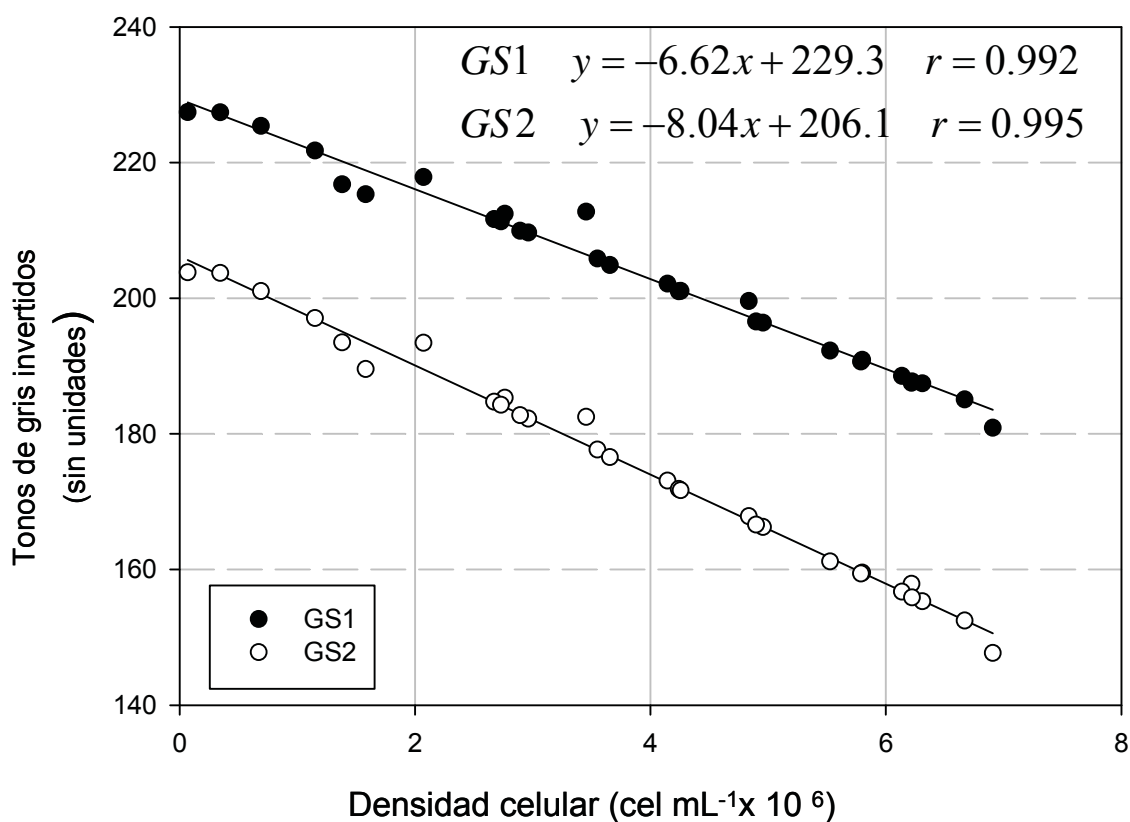


Fig. 18. Análisis de regresión de dos algoritmos de escala de grises (GS1 = MATLAB, GS2 = Gonzales & Woods) y el número de células por mililitro de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO).

En la Figura 19 se muestra las curvas de escala de grises con el algoritmo propuesto M1, optimizado para el color de nuestra microalga, también resulto tener un coeficiente de correlación favorable de 0.997.

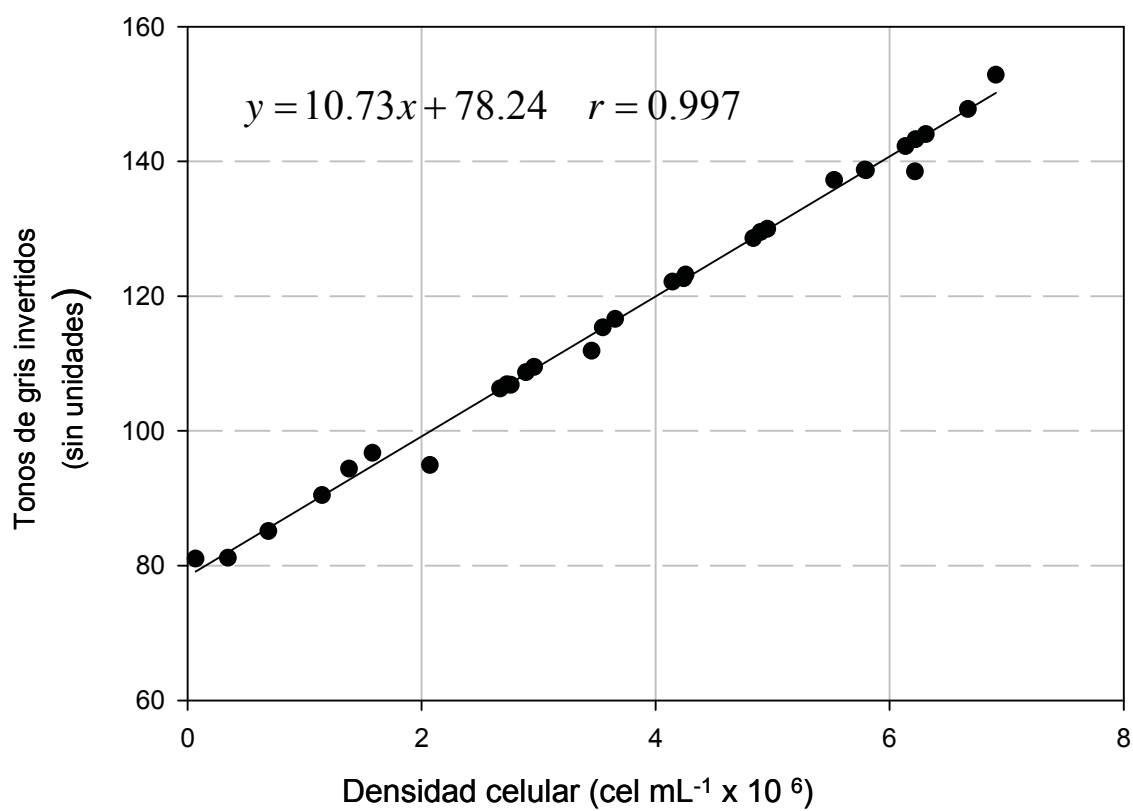


Fig. 19. Análisis de regresión de luminiscencia algoritmo propuesto (M1) y el número de células por mililitro de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO).

7.1.2 Evaluación de biomasa desconocida

La Tabla III muestra diferencias porcentuales de densidad celular en comparación con los resultados generados con el contador Coulter para los dos algoritmos de escala de grises estándar (GS1 y GS2) y el propuesto (M1).

Tabla III. Comparaciones de densidad celular de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) ($\times 10^6$ células mL⁻¹) con el estándar electrónico de conteo de células (EC) utilizando un contador Coulter y los tres algoritmos para procesar imágenes digitales (GS1, GS2 y M1). Entre paréntesis intervalos al noventa y cinco por ciento de confianza.

Modelos						
	GS1		GS2		M1	
EC	DP	% Diff	DP	% Diff	DP	% Diff
0.062(.066)	0.267	76.78	0.253	75.49	0.113	45.13
0.071(.069)	0.262	72.90	0.255	72.16	0.112	36.61
0.076(.063)	0.366	79.23	0.322	76.40	0.179	57.54
0.081(.072)	0.373	78.28	0.338	76.04	0.196	58.67
1.52(.06)	1.67	8.98	1.66	8.43	1.638	7.79
3.02(.061)	3.22	6.21	3.22	6.20	3.207	6.20
4.51(.122)	4.71	4.25	4.69	3.84	4.675	3.65
6.12(.096)	5.99	2.17	6.21	1.45	6.09	0.49
7.11(.102)	7.53	5.58	7.53	5.58	7.022	1.24
8.10(.122)	8.02	1.00	8.03	0.87	8.032	0.84
9.30(.129)	8.52	9.15	8.53	9.03	8.232	11.49
11.2(.093)	9.02	24.17	9.03	24.03	8.331	25.61

Amplitud de operación

7.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS)

7.2.1 LED ROJO sistema "A"

En la Figura 20 se muestran los tamaños y números de células de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) con LED ROJO en el sistema "A" al tiempo cero y a los 5 días.

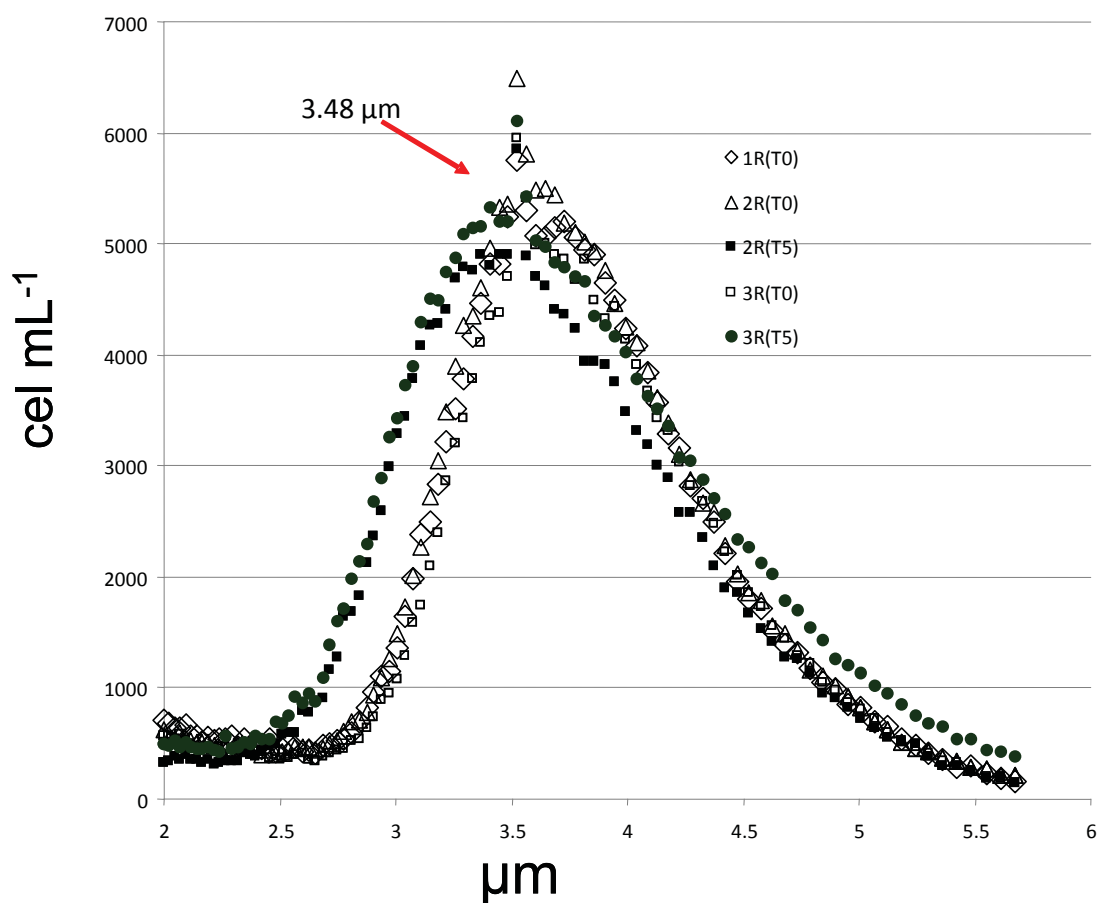


Fig. 20. Número de células y tamaño de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) con LED ROJO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema "A" a una intensidad lumínica de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las gráficas 1R(T0), 2R(T0) y 3R(T0) corresponden al tiempo cero y 1R(T5), 2R(T5) y 3R(T5) al tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en tamaño o número de células ($P > 0.05$, $n=3$).

7.2.2 LED BLANCO sistema “A”

En la Figura 21 se muestran los tamaños y números de células de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) con LED BLANCO en el sistema “A” al tiempo cero y a los 5 días.

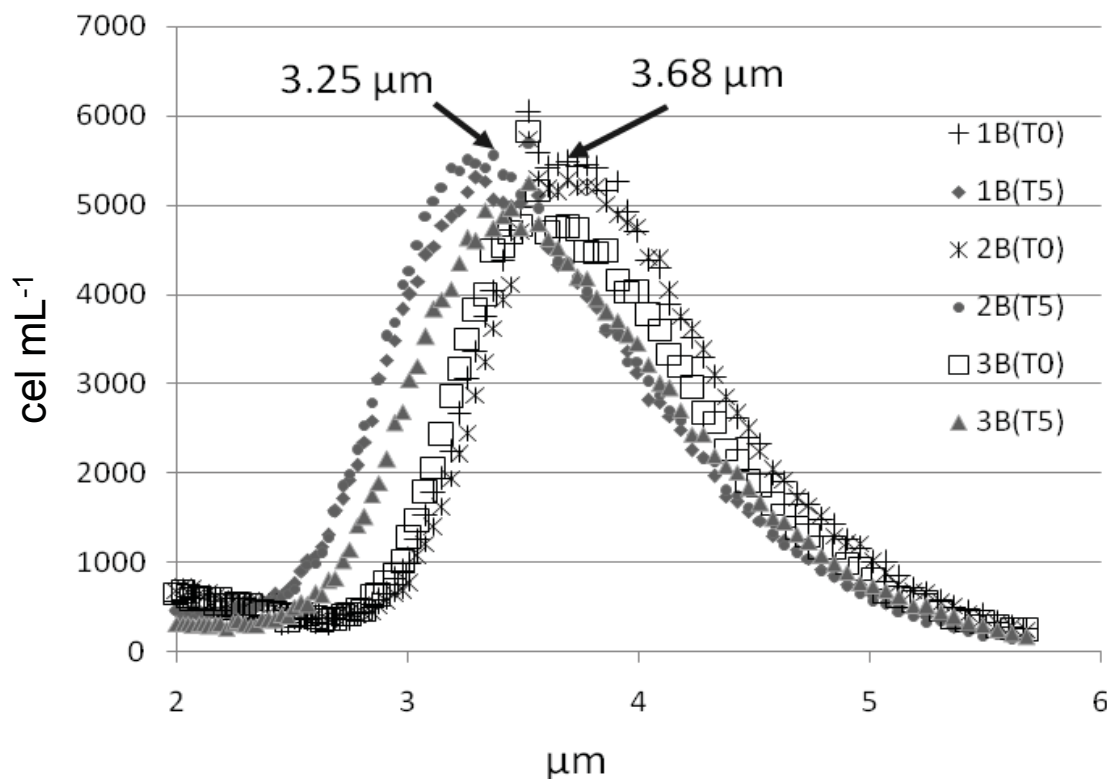


Fig. 21. Número de células y tamaño de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) con LED BLANCO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema “A” (n=3) a una intensidad lumínica de $5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las gráficas 1B(T0), 2B(T0) y 3B(T0) corresponden a tiempo cero y 1B(T5), 2B(T5) y 3B(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. . No hubo diferencias significativas en tamaño o número de células ($P > 0.05$, n=3).

7.2.3 LED ROJO sistema “B”

En la Fig. 22 se muestran los tamaños y números de células de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO en sistema “B” en tiempo cero y tiempo 5 días.

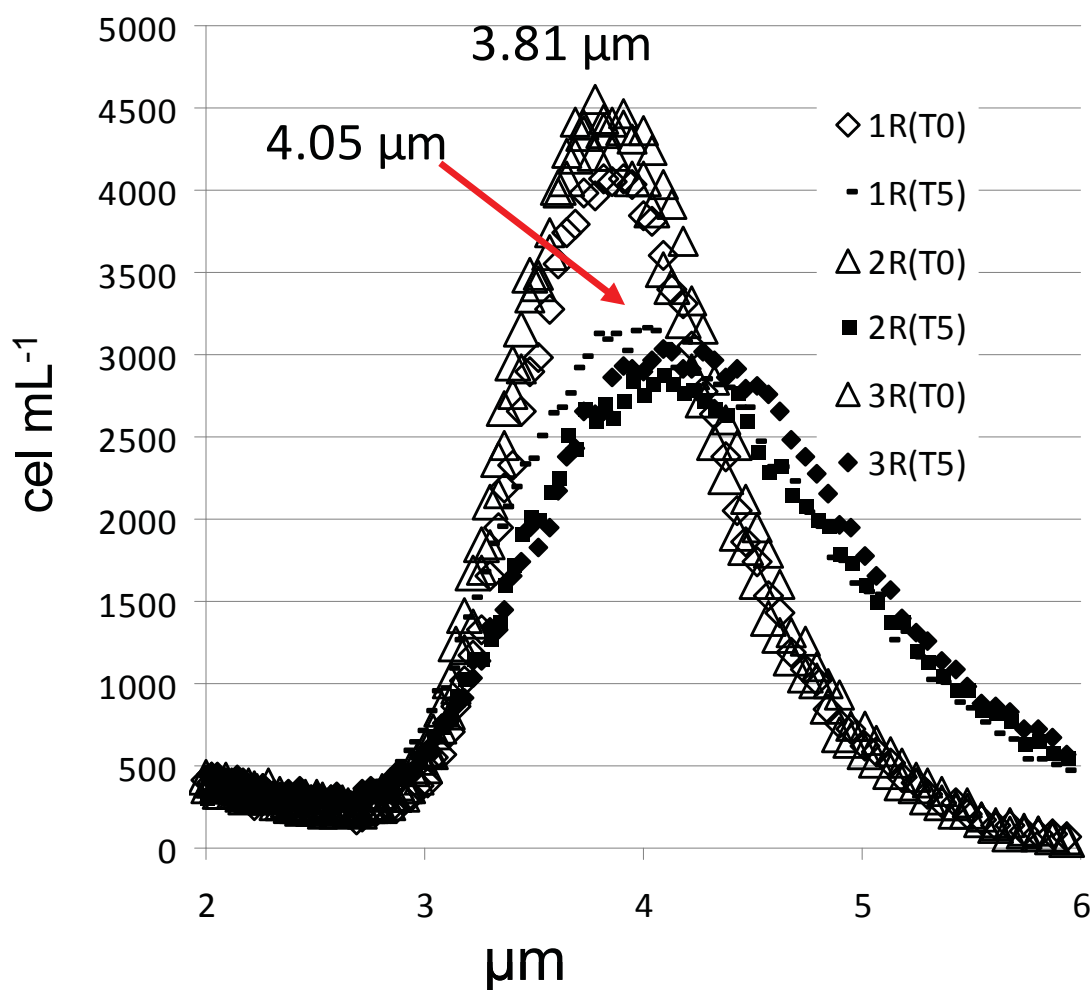


Fig. 22. Numero células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO en tiempo cero (T0) y tiempo 5 días (T5) en sistema “B” (n=3) a una intensidad lumínica de $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las gráficas 1R(T0), 2R(T0) y 3R(T0) corresponden a tiempo cero y 1R(T5), 2R(T5) y 3R(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en tamaño o número totales de células mL^{-1} ($P > 0.050$). (n=3)

7.2.4 LED BLANCO sistema “B”

En la Figura 23 se muestran las variaciones en tamaño y número de células de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED BLANCO en el sistema “B” al tiempo cero y a los 5 días.

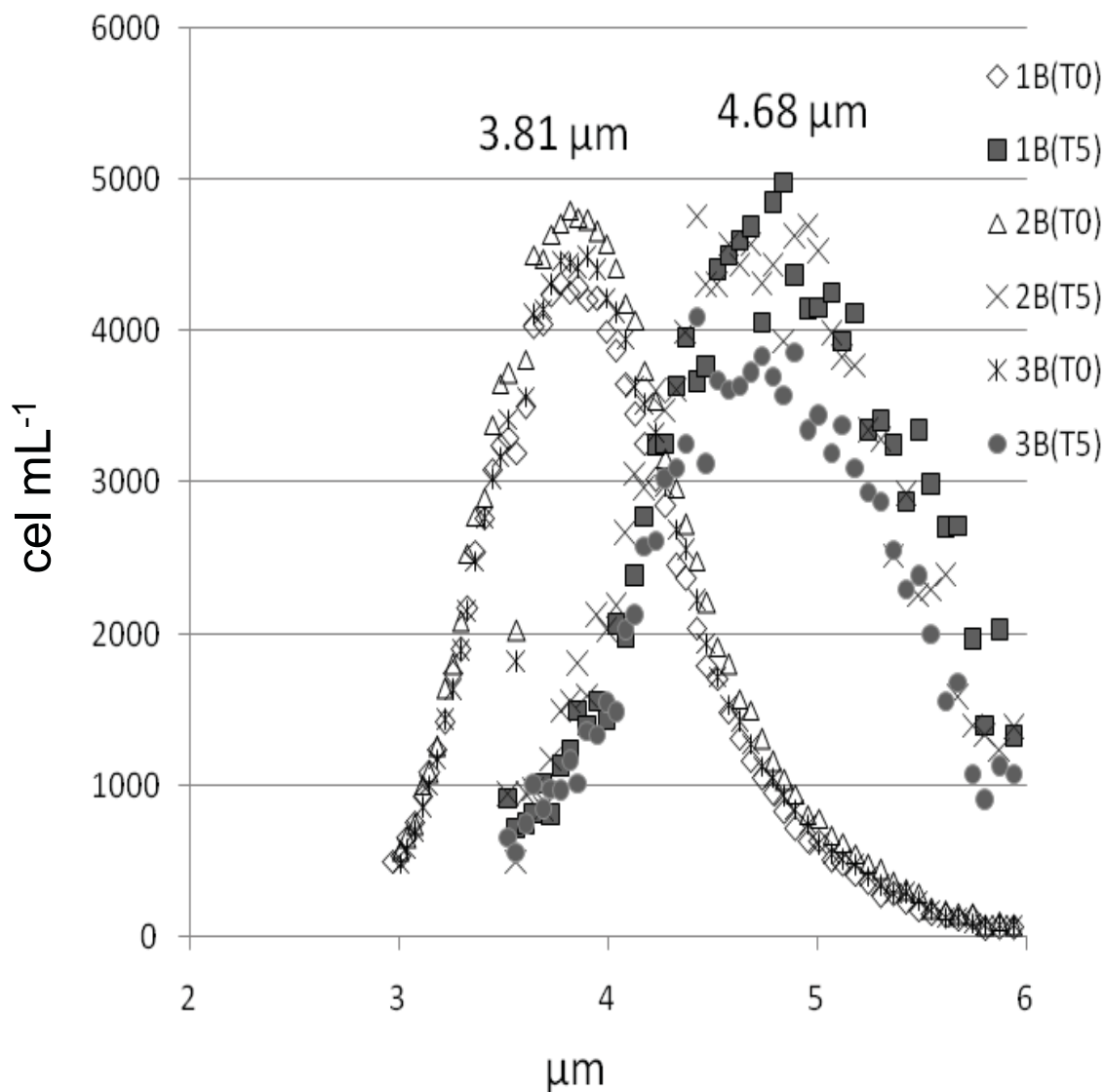
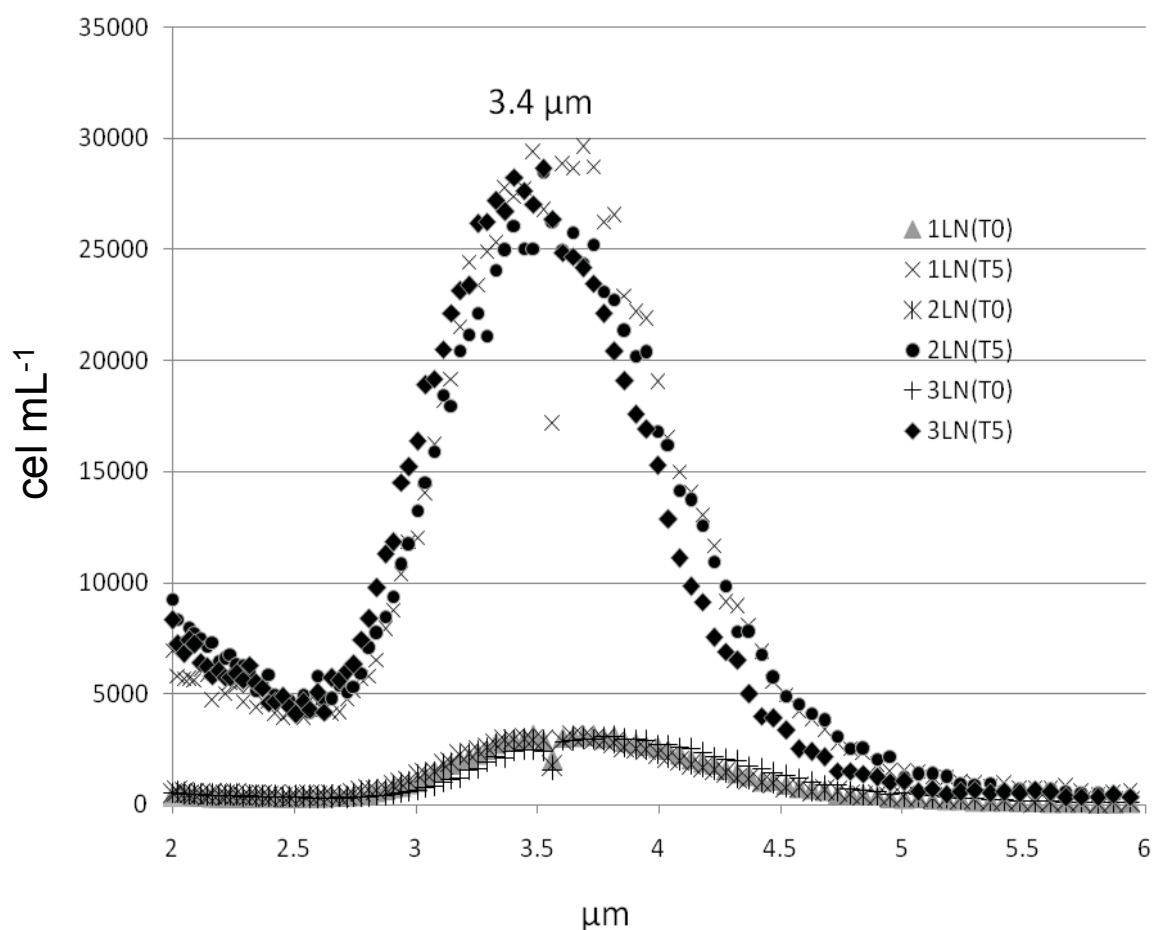


Fig. 23. Número células y tamaño de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED BLANCO al tiempo cero (T0) y a los 5 días (T5) en sistema “B” (n=3) a una intensidad lumínica de $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las gráficas 1B(T0), 2B(T0) y 3B(T0) corresponden a tiempo cero y 1B(T5), 2B(T5) y 3B(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en número de células ($P > 0.05$) pero sí hubo diferencias en tamaño ($P < 0.05$, n=3).

7.2.5 LUZ FLUORESCENTE (grupo control)

En la Fig. 24 se muestran los tamaños y números de células de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO, LED BLANCO y luz fluorescente (grupo control) al tiempo cero y a los 5 días. .



Isochrysis aff. *galbana* (T-ISO) con tubo fluorescente blanco (General Electric Co. México, México) a $60 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ colocado horizontalmente (grupo control). El grupo control se utilizó para comparar crecimiento en sistemas experimentales con LEDs "A" y "B". Las gráficas 1LN(T0), 2LN(T0) y 3LN(T0) corresponden a tiempo cero y 1LN(T5), 2LN(T5) y 3LN(T5) a tiempo 5 días, respectivamente. No hubo diferencias significativas en tamaño ($P > 0.050$) pero si hubo diferencias en número de células ($P < 0.05$, $n=3$).

7.2.6 Determinación de productividad

En la Tabla IV se muestran las variaciones de productividad en *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO, LED BLANCO y luz fluorescente (grupo control) para sistema “A” y B”.

Tabla IV. Productividad en mg/L/día de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) en sistemas “A” y “B” con diferentes aplicaciones de luz. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=3).

	LED ROJO	LED BLANCO	FLUORESCENTE
	mg L⁻¹d⁻¹	mg L⁻¹d⁻¹	mg L⁻¹d⁻¹
SISTEMA “A”	8.12 \pm 0.32	9.30 \pm 1.66	43.56 \pm 15.83
SISTEMA “B”	2.79 \pm 1.16	8.43 \pm 2.98	32.36 \pm 4.72

7.2.7 Crecimiento LED ROJO, BALNCO y LUZ FLUORESCENTE

En la Tabla V se muestran las variaciones de crecimiento en *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED ROJO para sistema “A” y B”. Mientras Tabla VI se muestran las variaciones de crecimiento en *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) con LED BLANCO para sistemas “A” y B”. Finalmente, la Tabla VII muestra las variaciones de crecimiento en *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) pero con luz fluorescente (grupo control) para sistemas “A” y B”.

Tabla V. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular ($\mu\text{g}/\text{cel}$), Crecimiento poblacional μe (d^{-1}), Crecimiento poblacional de duplicación $\mu 2$ (d^{-1}) y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) en sistemas "A" y "B" con LED ROJO. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).

SISTEMA	LUZ	Número de Células (día 5) (células mL^{-1})	Porcentaje de Crecimiento (%)	Peso Celular Final ($\mu\text{g}/\text{cel}$)	Crecimiento Poblacional μe (d^{-1})	Crecimiento Poblacional de duplicación $\mu 2$ (d^{-1})	Crecimiento días de duplicación celular tg (días)
"A"	LED ROJO	4.17E+06	17.33	101.9	0.032	0.046	21.7
	LED ROJO	4.30E+06	21.84	48.7	0.040	0.057	17.5
	LED ROJO	2.02E+06	10.24	75.3	0.019	0.028	35.6
	LED ROJO	3.04E+06	50.60	68.5	0.082	0.118	8.5
	MEDIA	3.38E+06	25.00	73.6	0.043	0.062	20.8
	STD	1.07E+06	17.72	22.0	0.027	0.0	11.3
<hr/>							
"B"	LED ROJO	5.17E+06	13.11	59.3	0.025	0.036	28.1
	LED ROJO	5.45E+06	41.54	97.1	0.069	0.100	10.0
	LED ROJO	6.10E+06	34.87	78.8	0.060	0.086	11.6
	LED ROJO	2.76E+06	14.76	179.2	0.028	0.040	25.2
	MEDIA	4.87E+06	26.07	103.6	0.045	0.065	18.7
	STD	1.46E+06	14.29	52.7	0.023	0.0	9.3

Tabla VI. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular ($\mu\text{g cel}^{-1}$), Crecimiento poblacional $\mu\text{e (d}^{-1}\text{)}$, Crecimiento poblacional de duplicación $\mu\text{2 (d}^{-1}\text{)}$ y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) en sistemas "A" y "B" con LED BLANCO. Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).

SISTEMA	LUZ	Número de Células (día 5) (células mL^{-1})	Porcentaje de Crecimiento (%)	Peso Celular Final ($\mu\text{g cel}^{-1}$)	Crecimiento Poblacional $\mu\text{e (d}^{-1}\text{)}$	Crecimiento Poblacional de duplicación $\mu\text{2 (d}^{-1}\text{)}$	Crecimiento días de duplicación celular tg (días)
"A"	LED	3.98E+06	11.66	36.2	0.022	0.032	31.4
	BLANCO						
	LED	4.05E+06	10.59	53.8	0.020	0.029	34.4
	BLANCO						
	LED	3.64E+06	9.15	40.2	0.018	0.025	39.6
	BLANCO						
	LED	2.26E+06	10.28	60.9	0.020	0.028	35.4
	BLANCO						
MEDIA		3.48E+06	10.42	47.8	0.020	0.029	35.2
STD		8.32E+05	1.03	11.5	0.002	0.0	3.4

"B"	LED	6.34E+06	59.84	101.2	0.094	0.135	7.4
	BLANCO						
	LED	3.09E+06	22.79	176.1	0.041	0.059	16.9
	BLANCO						
	LED	3.01E+06	5.69	176.2	0.011	0.016	62.6
	BLANCO						
	LED	2.71E+06	5.33	128.7	0.010	0.015	66.8
	BLANCO						
MEDIA		3.79E+06	23.41	145.5	0.039	0.056	38.4
STD		1.71E+06	25.62	37.1	0.039	0.1	30.7

Tabla VII. Concentraciones celulares ($\times 10^6$), Porcentaje de crecimiento (%), Peso celular (ng cel^{-1}), Crecimiento poblacional $\mu\text{e (d}^{-1}\text{)}$, Crecimiento poblacional de duplicación $\mu\text{2 (d}^{-1}\text{)}$ y días de duplicación tg (días) al final de 5 días de cultivo de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) en sistemas "A" y "B" con luz FLUORESCENTE (grupo control). Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=4).

SISTEMA	LUZ	Número de Células (día 5) (células mL^{-1})	Porcentaje de Crecimiento (%)	Peso Celular Final (ng cel^{-1})	Crecimiento Poblacional $\mu\text{e (d}^{-1}\text{)}$	Crecimiento Poblacional de duplicación $\mu\text{2 (d}^{-1}\text{)}$	Crecimiento días de duplicación celular tg (días)
"A"	FLUORESCENTE	1.06E+07	219.64	30.2	0.232	0.335	3.0
	FLUORESCENTE	5.24E+06	56.13	45.4	0.089	0.129	7.8
	FLUORESCENTE	1.17E+07	245.66	24.7	0.248	0.358	2.8
	FLUORESCENTE	1.60E+07	662.57	19.0	0.406	0.586	1.7
MEDIA		1.09E+07	296.00	29.8	0.244	0.352	3.8
STD		4.43E+06	258.37	11.4	0.130	0.2	2.7

"B"	FLUORESCENTE	9.82E+06	143.26	60.6	0.178	0.257	3.9
	FLUORESCENTE	8.79E+06	187.04	57.3	0.211	0.304	3.3
	FLUORESCENTE	7.67E+06	178.33	39.4	0.205	0.295	3.4
	FLUORESCENTE	6.78E+06	125.19	51.6	0.162	0.234	4.3
MEDIA		8.27E+06	158.45	52.2	0.189	0.273	3.7
STD		1.33E+06	29.15	9.3	0.023	0.0	0.5

7.2.10 Tamaño de micoralgas con LEDS ROJO y BLANCO y con LUZ FLUORESCENTE (grupo control)

En la Figura 25 se muestran imágenes de fotografías microscópicas de las variaciones de tamaño de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) después de 5 días de los tres tratamiento de luz en el experimento con sistema “B”. Se observó que las microalgas de mayor tamaño son los que fueron cultivados con luz fluorescente, seguidos por LED blanco y luego LED rojo.

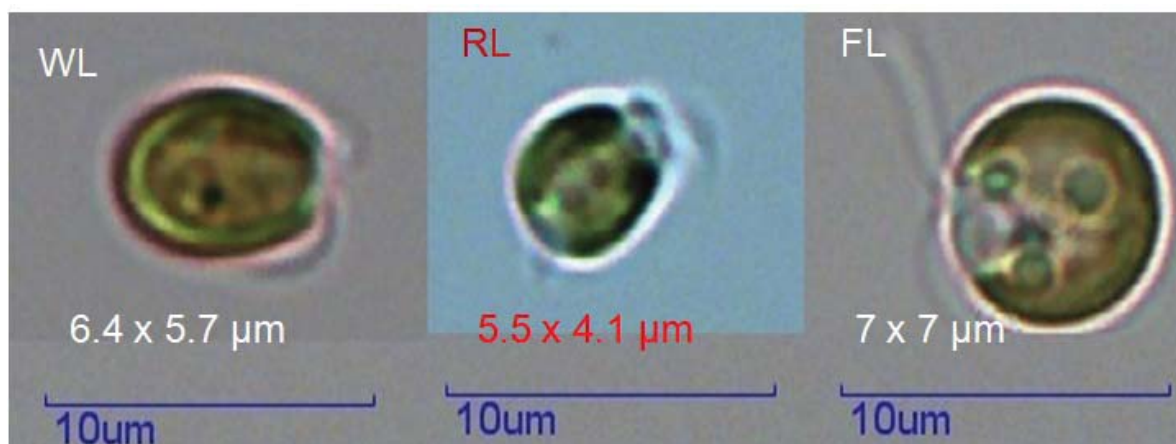


Fig. 24. Detalle fotográfico de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) con LEDs rojo y blanco y luz fluorescente (grupo control) después de 5 días de tratamiento de luz en el experimento con sistema “B”. (RL= LED rojo, WL = LED blanco, FL=Luz Fluorescente (100X)).

7.2.11 Contenido Bioquímico

En la Tabla VIII se muestran las variaciones en la concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), cultivada en los sistemas “A” y “B”.

Tabla VIII. Concentración promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) al final de 5 días de cultivo en sistemas “A” y “B” con LED ROJO y BLANCO y con luz FLUORESCENTE (FL). Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=6)

		PROTEINAS	CARBOHIDRATOS	LIPIDOS
		mg g ⁻¹	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹
SISTEMA “A”	LED ROJO	177 \pm 21	135 \pm 44	517 \pm 93
	LED BALNCO	150 \pm 46	43 \pm 2	461 \pm 99
	FL	90 \pm 38	81 \pm 23	537 \pm 65
SISTEMA “B”	LED ROJO	322 \pm 57	87 \pm 37	356 \pm 77
	LED BALNCO	301 \pm 28	75 \pm 19	388 \pm 68
	FL	276 \pm 47	80 \pm 10	378 \pm 18

En la Figura 25 se muestran las variaciones porcentuales de proteínas, carbohidratos, lípidos de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), cultivada en sistema “B” con LED Rojo, Blanco y luz fluorescente donde se observa que no existen diferencias significativas ($P > .05$).

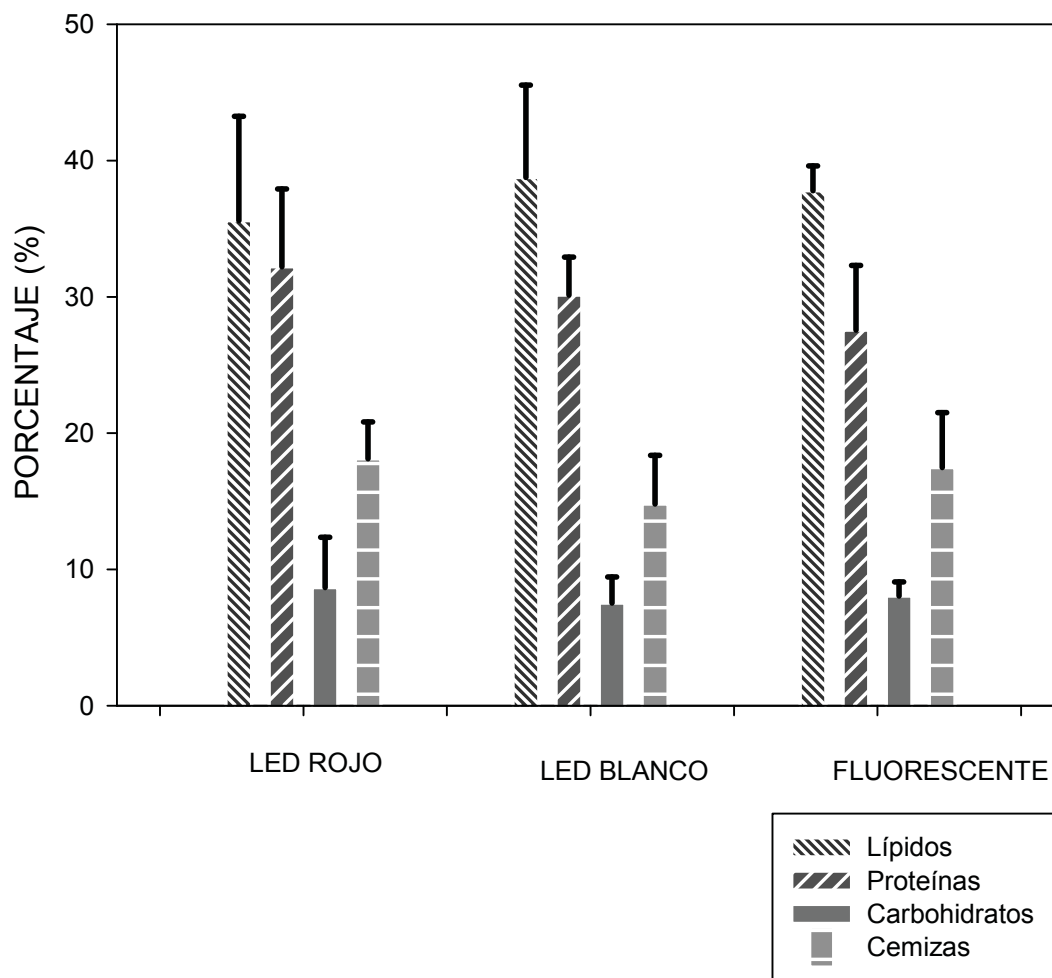


Fig. 25. Porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) al final de 5 días de cultivo en sistema “B” con LED ROJO y BLANCO, con luz FLUORESCENTE . Los datos son la media \pm la desviación estándar (n=3)

8.0 DISCUSIÓN

8.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA

8.1.1 Generación de la curva de calibración

Para las curvas de escala de grises con el método utilizado por el software MATLAB, y la escala de grises indicado por González & Woods (1992) los coeficientes de correlación fueron 0.992, 0.995, respectivamente (Fig. 18). El algoritmo propuesto M1, optimizado para el color de nuestra microalga, también resulto tener un coeficiente de correlación favorable de 0.997 (Fig. 19).

El rango dinámico se calcula dividiendo las pendientes de curvas de calibración y se comprobó que el nuevo algoritmo M1 aumentó el rango dinámico 62.1% y 32.9% en comparación con los modelos de GS1 y GS2, respectivamente.

8.1.2 Evaluación de biomasa desconocida

En los tres experimentos independientes para estudiar el funcionamiento del sistema y la metodología para medir la biomasa. Utilizando la curvas de calibración de escala de grises (GS1 y GS2) y el algoritmo modificado (M1) se midieron densidades desconocidas de células *I. galbana* (T-ISO) para simular tres secciones de la curva de crecimiento de las microalgas: la fase lag (de baja densidad celular), fase exponencial (media densidad celular), y la fase estacionaria (de alta densidad celular). Se encontró para todos los algoritmos (GS1, GS2 y M1), en la región de interés, pequeñas diferencias porcentuales en comparación con los resultados generados con el contador Coulter. Para densidades celulares de 1.52×10^6 y 8.1×10^6 cel mL⁻¹ se encontraron diferencias menores de 10%. Este resultado es ventajoso porque corresponden a las fases exponenciales y estacionarias de la curva de crecimiento donde generalmente se realiza la cosecha.

Por otra parte, se encontró que el nuevo algoritmo propuesto M1, demostró generalmente diferencias porcentuales más bajas, seguido de GS2 y GS1. Todos los algoritmos presentaron deficiencias para medir biomasa de baja densidad celular ($\leq 81 \times 10^3$) o muy alta densidad celular ($\geq 11.2 \times 10^6$), indicando el límite de medición del sistema.

En esta primera línea de investigación, con base en los resultados presentados, puede afirmarse que los objetivos establecidos para medir la biomasa de la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) a través de imágenes digitales fueron cubiertos en forma satisfactoria. Así, resultó posible llevar a cabo una comparación de la efectividad del sistema para medir la biomasa utilizando, como marco de referencia, el que proporciona el estándar del contador Coulter. El algoritmo desarrollado permitió una escala dinámica mayor de lo que provee los estándares algoritmos para escalas de grises y señala un esquema metodológico para la medición de biomasa en otras microalgas a través de imágenes digitales. Por otra parte, se obtuvo evidencia suficiente para verificar la hipótesis establecida por la presente investigación. Se mostró que es factible utilizar imágenes digitales para modelar el crecimiento de una microalga. El algoritmo propuesto demostró tener capacidad entre ciertos límites de densidad celular, de medir biomasa de una manera económica, rápida y fácil.

Así mismo, el sistema desarrollado demostró tener excelentes propiedades para posibles esquemas de automatización, la estimación de biomasa, lo que es particularmente deseable para sistemas de biomonitorio. La medición de biomasa continuará siendo importante en el futuro para cultivos de microalgas en la industria y para experimentación. El sistema propuesto en este trabajo constituye una manera fácil y económica para la medición de biomasa total. Sin embargo, debido a necesidad de conocer la calidad de la biomasa, además de la cantidad, otras técnicas serán necesarias.

Además, debido a que ningún método de medición es ideal, es probable que métodos en el futuro incorporen varias de las técnicas de medición de biomasa para generar un control mayor de la calidad de la cosecha microalgal.

No obstante lo anterior, es importante resaltar que el sistema desarrollado podría ser una parte valiosa en dichos sistemas de biomonitorio, ya que es fácil y económico de

implementar. Esta particularidad del sistema, para describir el crecimiento microalgal de forma económica podrá ser trascendente.

8.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS)

En esta segunda línea de investigación, se aplicó a la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) luz monocromática roja y blanca con LEDS y se determinó densidad celular, tamaño, productividad, crecimiento y contenido bioquímico y se comparó con luz fluorescente (grupo control).

8.2.1 Densidad y tamaño celular

En sistema “A” con LEDs Rojo y Blanco se encontró que no hubo cambio de densidad celular o tamaño ($P > 0.05$) después de los 5 días de tratamiento posiblemente por la baja intensidad lumínica de $5 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido al fondo de los matraces). En cambio en el sistema “B” si se observó un cambio de tamaño significativo en tamaño celular ($3.81 \mu\text{m}$ a $4.68 \mu\text{m}$) con LED Blanco ($P < 0.05$) pero no en densidad celular. El cambio en densidad celular con LEDs blanco y rojo no era significativo ($P > 0.05$) a pesar de la intensidad lumínica de $60 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ era igual al tratamiento de luz del grupo control con luz fluorescente. Para el grupo control (fluorescente) el cambio de densidad celular era favorable y sí era significativo ($P < 0.05$), por otro lado el cambio de tamaño promedio de las células no era significativo ($p > 0.05$).

8.2.2 Productividad

En ambos sistemas “A” y “B” la productividad era muy bajo casi 4 a 15 veces más bajo que con luz fluorescente (grupo control). En sistema “A” y “B” la productividad eran muy similares en los tres tratamientos, a excepción de los LEDs rojo que incongruentemente mostró una productividad más bajo, posiblemente porque al iniciar el experimento había menor densidad celular en el cultivo.

8.2.3 Crecimiento

En ambos sistemas “A” y “B” era siempre más alto el crecimiento de las microalgas con luz fluorescente (grupo control). Alcanzo densidades celulares desde 8.27×10^6 hasta 10.9×10^6 . Asimismo, el promedio de duplicación (tg) de 3.7 a 3.8 días con luz fluorescente también era mejor que todos los tratamientos para ambos experimentos con sistema “A” y “B”, respectivamente. Estos valores aunque fueron los más bajos sugieren que a los 5 días de tratamiento con luz *I. galbana* (T-ISO) había alcanzado su máximo crecimiento poblacional y entraba a la fase de saturación y el crecimiento celular se retrasaba. Típicos valores de duplicación celular (tg) en la fase exponencial para *I. galbana* (T-ISO) en la literatura es de 1.15 días (Fotoon *et al.*, 2007). Los valores de duplicación celular (tg) para LEDs blanco y rojo para ambos sistema “A” y “B” son excesivos indicando que no son congruentes y sugieren que la microalga no estaba duplicando. Por lo tanto, las microalgas iluminadas con LEDS se encontraban en un estado estacionario debido a la poca o nula respuesta de crecimiento, manteniendo homeostasis utilizando sus reservas, mientras esperaba mejores condiciones lumínicas para su desarrollo.

8.2.4 Imágenes de fotografías microscópicas de tamaño celular

En el sistema “B” se tomaron imágenes digitales (Fig. 25) después de los tratamientos con luz (día 5) y se observó que el tamaño de la microalga *I. galbana* (T-ISO) es mayor con luz fluorescente, seguido en tamaño las microalgas con el tratamiento de LEDs blanco y por último el más pequeño es con el tratamiento con LEDs rojo. No se tomaron fotografías microscópicas del tratamiento de luz con el sistema “A”. Diferencias de tamaño celular de *I. galbana* (T-ISO) con LEDs rojo y blanco no se ha reportado previamente en la literatura.

Estos datos difieran notablemente de los resultados de tamaño de la microalga medido con el contador Coulter. Se especula que esto es debido a que el protocolo metodológico para conteo celular y medición de tamaño con el contador Coulter requiere la adición de formol de 4 a 10% y causa que las microalga se deshidraten, mueran y se

vuelvan más pequeñas. Por lo tanto, existe la posibilidad que el contador de Coulter esta subestimando los valores reales. Esta disminución de tamaño celular con el contador de Coulter se ha reportado en la literatura (Iwasawa *et al.*, 2009). También se ha reportado que los números de tamaño pueden ser inexactos con el contador de Coulter cuando las células no son esféricas (Harbison y McAlister, 1980; Nilsson, 1990; Montagnes *et al.*, 1994).

8.2.5 Composición bioquímica celular

En ambos sistemas “A” y “B” los resultados de concentración promedio de proteínas, carbohidratos, lípidos y de *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) al final de 5 días de cultivo con LED rojo y blanco y con luz fluorescente eran muy similares y coinciden a los valores típicamente reportado en la literatura para esta microalga (Brown *et al.*, 1989). Sin embargo las diferencias en concentración de proteínas de sistema “A” y “B” son muy diferentes (Tabla VIII). El sistema “A” las cantidades de proteicas fueron inusualmente bajos comparado a la literatura. Se teoriza debido a que liofilización se hizo en el sistema “A” en partes para lograr las 24 horas, en un sistema anticuado y se utilizó mucho formato de amonio para remover las sales posiblemente se hidrolizaron una buena cantidad de las proteínas. A diferencia de sistema “B” donde se logró liofilizar inmediatamente en un día en una liofilizadora nueva y se utilizó muy poca formato de amonio.

En esta segunda línea de investigación, con base en los resultados presentados, puede afirmarse que los objetivos establecidos para aplicar luz monocromática suministrado con LEDs fue cubierta. Por otra parte, se obtuvo evidencia para rechazar la hipótesis propuesta por la presente investigación. Se mostró que la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) no crece o crece muy poco con luz de LEDs rojo y blanco (primariamente azul) independientemente de la intensidad utilizada. Este resultado es totalmente diferente a los resultados reportados en la literatura para crecimiento en otras microalgas con LEDs rojo y azul (Matthijs *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2007), lo cual implica posiblemente que la microalga *I. galbana* (T-ISO) requiere otra longitud o longitudes de onda para crecer. Esta pudiera ser la explicación, porque en todos los anteriores experimentos con luz monocromática reportado en la literatura fueron realizados con

microalgas verdes, mientras *I. galbana* (T-ISO) es de color amarillo dorado y por lo tanto posee otro perfil de pigmentos fotosintéticos.

9.0 CONCLUSIONES

9.1 SISTEMA PARA MEDIR BIOMASA

1.- Se encontró para todos los algoritmos (GS1, GS2 y M1), en la región de interés, de 1.52×10^6 a 8.1×10^6 pequeñas diferencias porcentuales en comparación con los resultados generados con el contador Coulter.

2.- En el rango de densidad celular de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) de 1.52×10^6 a 8.1×10^6 células mL^{-1} la diferencias de conteo celular eran menores de 10%.

3.- En el rango completo de densidad celular de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) de 6.2×10^4 a 11.2×10^6 células mL^{-1} la diferencias de conteo celular eran de un mínimo de 0.49% hasta un máximo de 79.23%.

4.- El método desarrollado utilizado de procesamiento de imágenes digitales no era muy preciso o exacto en muy altas concentraciones o muy bajas. Se observó que en el rango de densidad celular de *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) menores 6.2×10^4 o mayores a 11.2×10^6 células mL^{-1} la diferencias de conteo celular comparado al contador Coulter varía mucho en precisión independientemente del algoritmo (GS1, GS2 y M1) utilizado.

5.- El algoritmo desarrollado (M1) permitió una escala dinámica mayor de lo que provee los estándar algoritmos (GS1 Y GS2) para escalas de grises.

9.2 SISTEMAS DE CULTIVO CON LUZ MONOCROMÁTICA (LEDS)

1.- En todos los experimentos de cultivo las mayores concentraciones de inóculo se obtuvieron en los protocolos con luz fluorescente (media de 1.09×10^7 y 8.27×10^6 células

mL⁻¹ en sistemas “A” y “B”, respectivamente y el cambio de concentración celular si era significativo ($P < 0.05$) después de 5 días de tratamiento.

2. – En los protocolos con LED rojo no se observó crecimiento o incremento de población ($P > 0.05$) después de 5 días de tratamiento con intensidad $5 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sistema “A”) ni con $60 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sistema “B”).

3. – En los protocolos con LED blanco tampoco se observó crecimiento o incremento de población ($P > 0.05$) después de 5 días de tratamiento con intensidad $5 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sistema “A”) ni con $60 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sistema “B”).

4. – Aunque los datos del tamaño celular indicaban que las diferencias no eran significativas en la mayoría de los diferentes protocolos de luz, se especula que esto es debido a que el protocolo metodológico para conteo celular y medición de tamaño con el contador Coulter requiere la adición de formol de 10%. Por lo tanto, causó que las microalga se deshidraten, mueran y se vuelvan más pequeñas. En observaciones microscópicas con *I. galbana* (T-ISO) no tratadas con formol 10% se observó una tendencia de disminución de tamaño celular en los tratamientos de luz con LEDs en comparación con luz fluorescente (Tamaño: Fluorescente > LED blanco > LED rojo).

5. – Los valores menores de tiempo de duplicación (tg) con los protocolos con luz fluorescente con la media variando entre 3.8 ± 2.7 y 3.7 ± 5 días, en sistema “A” y “B”, respectivamente. Estos valores de duplicación sugieren que el crecimiento había alcanzado su fase de saturación porque valores típicas de duplicación celular para *I. galbana* (T-ISO) son de alrededor de 1.5 días en la fase exponencial.

6. – No se observó diferencias significativas ($P > 0.05$) en el contenido bioquímico de proteínas, carbohidratos o lípidos entre tratamientos en los diferentes protocolos con LED rojo y blanco y luz fluorescente, excepto en la cantidad de proteínas entre los sistemas “A” y “B”. Esta diferencia se debe en que en sistema “A” se utilizó mucho formato de amonio durante la cosecha y se puede suponer que se hidrolizaron y se perdieron la mitad de proteínas en sistema “A”.

7. –La baja cantidad proteica en el sistema “A” es posiblemente debido al uso excesivo de formato de amonio, causando hidrólisis y pérdida proteica. Las otras cantidades de lípidos, proteínas y carbohidratos son muy similares a esos reportados en la literatura.

9. – No se observaron microscópicamente bacterias en los cultivos.

10. – No se obtuvieron diferencias significativas en crecimiento poblacional o números de células en sistemas “A” y “B” en ninguno de los protocolos de luz con LEDs ($P > 0.05$), aunque la luz lumínica de los LEDs de sistema “B” era de $60 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo cual es 12 veces más que sistema “A” ($5 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se puede teorizar que *I. aff. galbana* (T-ISO) siendo una microalga amarillo en vez de verde, es menos eficiente en utilizar longitudes de onda rojo y azul para su fotosíntesis y crecimiento. Por lo tanto, posiblemente requiere otros u otras longitudes de onda que rojo y azul (el LED blanco utilizado emite principalmente luz azul).

11.- Los sistemas “A” y “B” diseñados y evaluados para aplicar luz monocromática con LEDs son los primeros realizados con *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) y se sugiere que es una herramienta útil para evaluar la producción de biomasa en otras especies de microalgas con LEDs .

LITERATURA CITADA

- Abalde, J., Fabregas, J. y Herrero, C. 1991. B-Carotene, Vitamin C, Vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen source. *Biores. Technol.* 38: 121–125.
- Abalde, J., Cid A., Hidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de la Coruña. España. 210 pp.
- Acién Fernández, F.G., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M. y Molina Grima, E. 1997. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. and Bioeng.* 55(5): 701-714.
- APHA, 1998. *Standard methods for the Examination of water and waste-water*. 20th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- Andreeva, A. V. y Kutuzov, M. A. 2001. Do plants have rhodopsin after all? A mystery of plant G protein-coupled signaling. *Plant physiology and biochemistry*, 39: 1027-1035.
- Apt, K.E. y Behrens, P.W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.* 35: 215-226.
- Arad, S. y Richmond, A. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—species of high potential: *Porphyridium* sp. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd., UK, pp. 289–298.
- Arredondo-Vega, B.O., Cordero-Esquivel, B., C., Herrero, C. y Abalde, J. 1997. *Manual de técnicas bioquímicas aplicadas a ficología*. CICESE, Universidad de la Coruña, España, 41 pp.
- Arredondo-Vega, B.O. y Voltolina, D. 2007. Determinación de Peso Seco y Contenido Orgánico e Inorgánico p. 27-30 En.: *Métodos y Herramientas Analíticas en la*

- Evaluación de Biomasa Microalgal. Arredondo Vega, B.O. y Voltolina D (ed). Centro Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 97 pp.
- Atalah, E., Cruz, C.M.H., Izquierdo, M.S., Rosenlund, G., Caballero, M.J., Valencia, A. y Robaina, L. 2007. Two microalgae *Cryptothecodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids. *Aquaculture*, 270 (1): 178-185.
- Barber, J. y Andersson, B. 1994. Revealing the blueprint of Photosynthesis. *Nature* 370: 255–261.
- Bartsch, H., Nair, J. y Owen, R. W. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 20: 2209–2218.
- Benemann, J. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4: 233-245.
- Becker, E.W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition, p. 312– 351. En: Richmond, A. (ed.) 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford. 584 pp.
- Becker, E.W. 2008. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology* Cambridge University Press. 304 pp.
- Berges, J. A., Charleboism D. O., Mauzerallm D. C. y Falkowsk P. G. 1996. Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae, *Plant Physiol.*, 110: 689-696.
- Billard, P y DuBow, M. S. 1998. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories, *Clin. Biochem.*, 31(1): 1–14.
- Bligh, G.E. y Dyer, J.W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(3): 911-917.
- Borowitzka, M. A. 1986. Microalgae as source of chemicals, *Microbiol. Sci.* 3(12): 372-375.
- Borowitzka, M. A. 1988a. Vitamins and fine chemicals from microalgae, p. 153–196. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (ed.), *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Borowitzka, M. A. 1988b. Fats, oils and hydrocarbons, p. 257–287. En : Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (ed.), *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Borowitzka, M.A. 1988c. Microalgae as sources of essential fatty acids. *Australian Journal of Biotechnology* 1: 58-62.
- Borowitzka,, M.A. 1992. Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. *J Appl Phycol* 4: 267-279.
- Borowitzka, M. A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol.*, 7: 3–15.
- Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70: 313–321.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. y Toole, V. K. 1952. Action spectra for light-induced germination in dormant lettuce seeds. *Proc. US Nat. Acad. Sci.*, 38: 662.
- Briggs, W.R. y Spudich, J.L. [Eds.]. 2005. *Handbook of Photosensory Receptors*. Wiley-VCH, Germany, 473 pp.
- Briggs, W.R. y Rice, H.V. 1972. Phytochrome : chemical and physical properties and mechanism of action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:293–334.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. y Garland, C. D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. *CSIRO Marine Reports*. No. 205. 44pp.
- Brown, M. R., Jeffrey, S.W., Volkman, J. K. y Dunstan, G. A. 1997: Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315–331.
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. y Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 11: 247–255.
- Butterwick, C. Heiney S.I., Talling, J.F. 1982. A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *J. Br. Phycol.* 17: 69-79.
- Carpenter, J.H. 1965. The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnol. Oceanogr.* 10: 135-140.

- Casper-Lindley, C. y Björkman, O. 1998. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth. Res.* 56: 277-289.
- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 593–604.
- Christie, W. W. 2003. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification, and Structural Analysis of Lipids*. Bridgewater, UK: Oily Press. 446 pp.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25: 294–306.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends in Biotechnology*, 26 (3): 126-131.
- Cohen, Z. [Ed.], 1999. *Chemicals from Microalgae*. Taylor y Francis Inc. USA. 419 pp.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. En: Richmond, A. (ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida. p.421-454.
- Cogne, G., Lasseur, C.H., Cornet, J.F., Dussap, C.G. y Gros, J.B. 2001. Growth monitoring of a photosynthetic micro-organism (*Spirulina platensis*) by pressure measurements. *Biotechnol.Lett.* 23: 1309–1314.
- Cornet, J. F. 1998. Le technoscope: les photobioréacteurs. *Biofutur*, 176: 1–10.
- Coulter, W. H. 1953. Means for counting particles suspended in a fluid. US patent 2656508.
- Czaplewski, R. L. y Parker, M. 1973. Use of a BOD oxygen probe for estimating primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 18: 152-154.
- Demmig-Adams, B. y Adams, W.W. III. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1: 21-26.
- Demirbas, A. 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50 (1): 14-34.
- De Pauw, N. y Persoone, G. 1988. Micro-algae for aquaculture. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algae Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Dickman, E. M., Vanni, M. J. y Horgan, M. J. 2006. Interactive effects of light and nutrients on phytoplankton stoichiometry. *Oecologia* 149: 676–689.

- Dubinsky, Z. 1986. Productivity of algae under natural conditions. In: Ricmont, A. (Ed.), CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 101-115.
- Dubinsky, Z. 1998. Listening to phytoplankton: Measuring biomass and photosynthesis by photoacoustics. *J. Phycol.* 34: 888–892.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28: 350-356.
- Duval, W.S., Brockington, P.J., Von Melville, M.S. y Green, G.H. 1974. Spectrophotometric determination of dissolved oxygen concentration in water. *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 1529-1530.
- Edmonson, W.T. 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments (R. A., Vollenweider, Ed), IBP Handbook No. 12, 2nd Ed, pp 14-16, Blackwell Sci. Pub. Oxford
- Falkowski, P. G. y Owens, T. G. 1980. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 66:592-595.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A. 1997. *Aquatic Photosynthesis.* Blackwell Scientific, Oxford, 375 pp.
- Falkowski, P. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research* 39: 235-258.
- FAO, 2008. SOFIA 2008. The State of World Fisheries and Aquaculture. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>
- Ferreira, A.P., Vieira, L.M. y Menezes, J.C. 2005. Evaluation of a new annual capacitance probe for biomass monitoring in industrial pilot-scale fermentations. *Journal of Biotechnology* 116(4): 403-409.
- Fiedler, P.C. y Talley, L.D. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review, *Progress in Oceanography*, 69 (2): 143-180.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. y Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science.* Jul 10; 281(5374): 237-40.

- Fleck-Schneider, P., Lehr F. y Posten C. 2007. Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*, *Journal of Biotechnology* 132(2): 134-141.
- Fogg, G.E. y Thake, B. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press, Madison, 268 pp.
- Fotoon A.Q. Sayegh, N.R. y D.J.S. Montagnes. 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*?, *Aquaculture*, Volume 273, Issue 4, 20 December 2007, Pages 665-678.
- Gales, P. 2000. A Comparison of visual Turbidity with Turbidity measured by commercially available instruments. *American society of Brewing chemists Journal*: 101-107.
- Gallagher, J. C. y Alberte, R. S. 1985. Photosynthetic and cellular photoadaptive characteristics of three ecotypes of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.)
- Gilmore, A.M. . 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 99: 197-209.
- Gitelson, A., Grits, Y.A., Etzion, D. y Ning, Z. 2000. Optical properties of *Nannochloropsis sp.* and their application to remote estimation of cell mass. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (5): 516–525.
- Gladue, R.M. y Maxey, J.E. 1994. Microalgae feeds for aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 6: 131-141.
- Gonzales, R. C. y Woods, R. E. 1992. En: *Digital Image Processing*. p411. Addison-Wesley Pub; 3rd ed. 730pp.
- Gore, M. G. 2000 En: M.G. Gore, (Ed.), *Spectrophotometry y Spectrofluorimetry, A Practical Approach*, p. 241–264. Oxford Univeristy Press, Oxford. 368 pp.
- Grasshoff, K. Ehrhardt, M. y Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Grasshoff, Ehrhardt y Kremling, eds. Verlag Chemie GmbH. 419 pp.
- Grotjohan, N. y Kowallik, W. 1989. Influence of blue light on the activity of phosphofractokinase in *Chlorella Kessleri*. *Physiol. Alga.* 75: 43-46.
- Guil-Guerrero, J. L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J. C., Campra-Madrid, P. y Reboloso-Fuentes, M.M. 2004. Functional properties of the biomass of three

- microalgal species. *J. Food Eng.* 65: 511–517.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *I. Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. En: Smith, W.L. y Chanley M.H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals. Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings - 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport .Plenum Press, New York, USA.* 338 pp.
- Hall, D.O. y Rao K.K. 1995. *Photosynthesis*, 5th edition. Cambridge University Press, USA. 211 pp.
- Hallegraeff, G. M. 1977. A comparison of different methods used for the quantitative evaluation of biomass of freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, 55: 145-165.
- Harbinson, G.R. y McAlister, V.L. 1980. Fact and artifact in copepod feeding experiments. *Limnol. Oceanogr.* 25: 971-981.
- He, P., Duncan, J. y Barber, J. 2007. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of Cultivation Parameters. *J Integrative Plant Biology* 49 (4): 447-451.
- Hedge, A.S. 2006. Development of a Biomass Transducer for Automated Microalgal Bioreactors. Tesis doctoral. Louisiana State, U.S.A.
- Hobson, N. S., Tothill, I. y Turner, A.P.F. 1996. Microbial detection. Review article. *Biosens. Bioelectr.* 11(5): 455–477.
- Honeywill, C., Paterson, D.M. y Hagerthey, S.E. 2002. Determination of microphytobenthic biomass using pulse-amplitude modulated minimum fluorescence, *European Journal of Phycology*, 37, Cambridge University Press: 485-492.
- Horsburgh, A.M., Mardlin D.P., Turner, N.L., Henkler R., Strachan, N., Glover, L.A., Paton, G.I. y Killham, K. 2002. On-line microbial biosensing and fingerprinting of water Pollutants. *Biosens. Bioelectron.* 17: 495–501.
- Iwasawa, K., Murata, A. y Taguchi, S. 2009. Cell shrinkage of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) during storage with preservatives *Plankton & Benthos Research* 4(3): 120.

- Koç, C. y Anderson, G. A. 2010. Use of RGB LEDs and Fluorescents Lamps as Light Sources to Grow Microalgae in a Photo-Bio Reactor (PBR). ASABE/CSBE North Central Intersectional Conference. October 7-9.
- Iwamoto, H. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products — major industrial species — *Chlorella*, p. 255–263. En Richmond, A. (ed.), Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford. 584pp.
- Jiang, Y., Chen, F. y Liang, S-Z. 1999: Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. Process Biochem., 34, 633–637.
- Jørgensen, E.G. 1964. Adaptation to different light Intensities in the diatom *Cyclotella rneghiniana* Kütz. Physiologia pl. 17. 136-145.
- Kamykowski, D. y Zentara, S.J. 1990. Hypoxia in the world ocean as recorded in the historical data set. Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers, 37 (12): p.1861-1874
- Katsuda, T., Shimahara, K., Shiraishi, H., Yamagami, K., Ranjbar, R. y Katoh, S. 2006. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 102 (5): 442-446.
- Kaplan, D., Cohen, Z. y Abeliovich, A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO). Biomass 9: 37-48.
- Kaplan, D. 2004. Water pollution and bioremediation by microalgae absorption and adsorption of heavy metals by microalgae, p.439-447. En: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond, A. (ed). Blackwell, Oxford. 584 pp.
- Kester, D. R. 1975. Dissolved gases other than CO₂, p. 498-556: En J. P. Riley y G. Skirrow [eds.]. Chemical oceanography. Chemical Oceanography, Vol. 1. Academic Press, London. 564 pp.
- Kim, B.C. y Gu, M.B. 2003. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. Biosens. Bioelectron. 18: 1015–1021.
- Kirk, J.T.O. 1983. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge Univ.

- Press, Cambridge, 401 pp
- Kirk, J.T.O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic systems, 2nd edition; Cambridge University Press, Cambridge, 509 pp.
- Kreslavsky, V.D., Kobzar, E.F. y Muzafarov, E.N. 1997. Effect of red radiation, kinetin and linuron on growth and ethylene production in *Chlorella*. *Biologia Plantarum* 39 (3): 427-430.
- Lee, C.G. y Palsson, B.Ø. 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to Red Light from Light-Emitting Diodes Leads to Autospore Release Following Each Cellular Division. *Biotechnol Prog* 12: 249-256.
- Lehto, K.M., Lehto, H.J. y Kanervo, E.A. 2006. Suitability of different photosynthetic organisms for an extraterrestrial biological life support system. *Research in Microbiology*, 157 (1): 69-76.
- Liu, C.P. y Lin, L.P. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* aff. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*,. 42:207-214.
- Li, J., Xu, N.S. y Su, W.W. 2003. Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement. *Biochemical Engineering Journal*, 14 (1): p.51.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F. y Hu, Q. 2009. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol.* 0921-8971 (Print) 1573-5176 (Online).
- López-Muñoz, I., Cid, A., Fidalgo, J.P. y Herrero, C. 1990. Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes intensidades de luz. *Actas III Congr. Acuicult.* 657-662.
- López-Muñoz, I., Abalde, J. y Herrero, C. 1992a. Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *NACC (Biología)*. 3: 59-65.
- López-Muñoz, I., Cid, A., Fidalgo, J.P. y Herrero, C. 1992b. Tasas de fotosíntesis de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* bajo diferentes condiciones de intensidad de luz y temperatura. *Biotec-92*. Santiago de Compostela.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Madrid, R. E. y Felice, C. J. 2005. Microbial biomass estimation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(3): 97-112.
- Maharajh, D.M. y Laloo, R. 2008. Indigenous algae: Potential factories for biodiesel production , Science real and relevant: 2nd CSIR Biennial Conference, CSIR International Convention Centre Pretoria, p 7.
- Maeda-Martínez, A. 1985. PhD Thesis, University of Southampton. UK, 155 pp.
- Mathews, S. y Sharrock, R.A. 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell and Environment.* 20, 666-671.
- Matthijs, H.C.P., Balke, H. y Van Hes, U.M. 1995. Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and Bioengineering* 50, 98–107.
- Martek. 2008. Martek Biosciences Corp. (MATK) Income statement . <http://finance.yahoo.com/q/is?s=MATKyearly>
- Markx, G.H., Davey, C.L., Kell, D.B. y Morris, P. 1991. The dielectric permittivity at radio frequencies and the Bruggeman probe: novel techniques for the on-line determination of biomass concentrations in plant cell cultures. *J. Biotechnol.* 20: 279-290.
- Maskow, T., Rollich, A., Fetzer, I., Ackermann, J.U. y Harms, H. 2008. On-line monitoring of lipid storage in yeasts using impedance spectroscopy. *Journal of Biotechnology.*, 135, 64-70.
- Masojidek, J., Torzillo, G., Koblizek, M., Kopecky, J., Bernardini, P., Sacchi, A. y Komenda, J. 1999. Photoadaptation of two members of the chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta* 209: 126-135.
- McAlice, B.J. 1971. Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter cell. *Limnol. Oceanog.* 16:19-28.
- McVey, J.P. 1993. p. 10: En *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean aquaculture*, CRC Press, 1993, 526 pp.

- Meireles, L.A., Azevedo, J.L., Cunha, J.P. y Malcata, X.F. 2002. On-line determination of biomass in a microalgal bioreactor using a novel computerized flow injection analysis system. *Biotechnol. Prog.* 18 (6): 1387–1391.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. y Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renewable Energy*, Chinese Academy of Sciences, 34 (1): 1-5
- Mendes, A., Guerra P., Madeira, V., Ruano, F., Lopes da Silva, T. y Reis, A. 2007. Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *Biotechnology Advances*. 21(4): 273-294.
- Metting, F. B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 477–489.
- Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J.A., Urda Cardona, J., Acien Fernandez, F.G. y Fernandez Servilla, J.M. 1994. Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a tubular bioreactor for the production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20, 279–290.
- Molina, G.E., Sanchez, P.J.A., Garcia, C.F., Fernandez, S.J.M y Fernandez, A.F.G. 1994. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) in chemostat culture. *Microbiol. Biotechnol.* 41: 23-27.
- Montagnes, D.J.S., Berges, J.A., Harrison, P.J. y Taylor, F.J.R. 1994. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 39: 1044-1060.
- Morris, I. 1980. Paths of carbon assimilation in marine phytoplankton. In- Falkowski, P. G. (ed.) *Primary productivity in the sea*. Plenum Press, New York, p. 139-159.
- Morris, I. 1981. Photosynthesis products, physiological state, and phytoplankton growth. In: Platt, T (ed.) *Physiological bases of phytoplankton ecology*. *Can. Bull Fish. Aquat.Sci.* 210: 83-102
- Müller, P, Li X.P. y Niyogi K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy *Plant Physiol*, 125, 1558-1566.

- Muller-Feuga, A. 1996. Microalgues marines. Les enjeux de la recherche. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Plouzané. 37pp.
- Nicholson, D.J., Kell, D.B. y Davey, C.L. 1996. Deconvolution of the dielectric spectra of microbial cell suspensions using multivariate calibration and artificial neural networks. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 39, 185-193.
- Nilsson, J.R. 1990. On the correlation of the volume of a prolate- spheroidal cell. *Tetrahymena*, as determined by electronic particle counters and by morphometry. *J Protozool* 37: 500-504.
- Niyogi, K.K., Björkman, O. y Grossman, A.R. 1997. Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9: 1369-1380.
- Nomura, Y., Hazekiy, O. y Tamura, M. 1997. Relationship between time-resolved and non-time-resolved Beer-Lambert law in turbid media, *Phys. Med. Biol.* 42: 1009-1022.
- Oguchi, M., Otsubo, K., Nitta, K., Shimada, A., Fujii, S., Koyano, T. y Miki, K. 1989. Closed and continuous algae cultivation system for food production and gas exchange in CELSS. *Advances in Space Research*, 9 (8): 169-177.
- Okuyama, T., Takeda, H., Yamamoto, H. y Yoshida, M. 1998. Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: Ultraviolet microscopic spectral analysis, *J Wood Sci* 44: 83-89.
- Oudot, C., Gerard, R., Morm, P. y Gningue, I. 1988. Precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system. *Limnol. Oceanogr.* 33: 146-150.
- Palmer, C.M. y Maloney, T.E. 1954. A new counting slide for nanoplankton. *American Society of Limnology and Oceanography, Special Publication* 21:1-6.
- Park, D.W., Qtae, J., Lim, H.J. y Benoit, V. 2002. Sterol composition of dark-grown *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) and its implication in the seed production of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Applied Phycol.* 14(5): 351-355.
- Parke, M. 1949. Studies on marine flagellates. *J.mar. biol. Ass. U.K.* 28: 255-286.
- Premkumar, J.R., Rosen, R., Belkin, S. y Lev, O. 2002. Sol-gel luminescence

- biosensors: Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. *Anal. Chim. Acta.* 462: 11–23.
- Prezelin, B.B. y Sweeney, B.M. 1978. Photoadaptation of photosynthesis in *Gonyaulax polyhedra*. *Mar Biol.* 48: 27-35.
- Pulz, O. y Scheibenbogen, K. 1998. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 59: 123–151.
- Pulz, O. y Gross, W. 2004: Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65: 635–648.
- Radway, J.C., Wilde, E.W., Whitaker, M.J. y Weissman, J.C. 2001. Screening of algal strains for metal removal capabilities. *J. Appl. Phycol.* 13: 451-455.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, N., Sridhar, S. y Rengasamy, R. 2008. *Critical Reviews in Microbiology*, Volume 34, (2): 77 – 88.
- Ratledge, C. 2004: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86: 807–815.
- Raven, J.A. 1986. Physiological consequences of extremely small size for autotrophic organisms in the sea. En: Platt, T., Li, W.K.W. (Eds.), *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aqual Sci.*, vol. 214, 1-70 pp.
- Redalje, D.G. y Laws, E.A. 1983. The effects of environmental factors on growth and the chemical and biochemical composition of marine diatoms. Light and temperature effects. *J. exp. mar Biol. Ecol.* 68: 59-79.
- Rowan, K.S. 1989. *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge, Cambridge University Press, 334pp.
- Rusch, K.A. y Malone, R. F. 1998. Microalgal production using a hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR): a conceptual model, *Aquaculture Engineering* 18: 251-264.
- Rusch, K.A. y Christensen, M.J. 2003. The hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR) for microalgal production, *Aquaculture Engineering* 27: 249-264
- Russ, J.C. 1999. *The Image Processing Handbook*, Third Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida. 771 pp.

- Ruyters, G. 1984. Effects of blue light on enzymes. In. Blue Light Effects in Biological Systems. Senger, H. (ed.). pp: 238-301. Springer-Verlag. Berlin. *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Adv*, 14: 401–35.
- Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P.G, Kiefer, D.A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J. y Takahashi, M. 1997. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research*, 19: 1637-1670.
- Sanchez, S., Martinez, M. y Espinola, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) in relation to culture medium, *Biochemical Engineering Journal*, 6(1): 13-18.
- Sandnes, J.M., Ringstad, T., Wenner, D., Heyerdahl, P.H., Källqvist, T. y Gislerød, H.R. 2006. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. *J Biotechnol*, 122(2): 209-215.
- Sarra, M., Ison, A.P. y Lilly, M.D. 1996. The relationships between biomass concentration, determined by a capacitance-based probe, rheology and morphology of *Saccharopolyspora erythraea* cultures. *Journal of Biotechnology*, 51: 157-165.
- Sedlář, J., Sedlářová, M. y Flusser, J. 2008. Digital Processing of Light Microscopy Images in Plant Pathogen Diagnostics. Workshop on Bio-Image Informatics: Biological Imaging, Computer Vision and Data Mining, UCSB, Santa Barbara, 1: 11-12.
- Serfling, R. E. 1949. Quantitative estimation of plankton from small samples of Sedgwick Rafter cell mounts of concentrate samples. *Trans. Amer. Micr. Soc* 68:185-199.
- Semina, H. J. 1978. Treatment of an aliquot sample. In Sournia, A. (ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, p. 181.
- Sheldon, R.W. y Parsons, T. R. 1967. *A Practical Manual on the Use of the Coulter Counter in Marine Science*. Coulter Electronics Sales Company, Canada. 66 pp.
- Soeder, C. y Stengel, E. 1974. Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate. In: *Algal Physiology and Biochemistry*. Stewart, W.D. (ed.). University of California.

- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M. y Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217–224
- Sornia, A. (ed.). 1978. *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris. *Monographs on Oceanographic Methodology* 6, 337 pp.
- Spiral Spring. 1991. *SOSA Texcoco, S.A de C.V.* www.spiralspring.com/h_Textos_sosa%20Tex%20Historico.pdf
- Spiral Spring. 2005. *¿Qué es? :Historia*. http://spiralspring.com/b_EueEs/frHistoria.html
- Steemann Nielson, E. y Hansen, V.Kr. 1959. Light adaptation in marine phytoplankton populations and its interrelation with temperature. *Physiol Plant*. 12, 353-370.
- Steemann Nielsen, E. y Jørgensen, E.G. 2006. The Adaptation of Plankton Algae. *Physiologia Plantarum*. Volume 21 Issue 3, Pages 647 – 654.
- Stein, J.R. (ed.). 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. 448 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Steinberg, D. K., Ducklow, H.W., Buesseler, K.O. y Bowles, M.C. 2003. Assessing contributions of JGOFS; Previewing studies in ocean ecology, biogeochemistry. *EOS Transactions American Geophysical Union* 84: 413-414.
- Stoicheva, N.G., Davey, C.L., Markx, G.H. y Kell, D.B. 1989. Dielectric spectroscopy: a rapid method for the determination of solvent biocompatibility during biotransformations. *Biocatalysis*, 2: 245-255.
- Strickland, J.D.H. y Parsons, T.R. 1968. Determination of dissolved oxygen. En: *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin, 167, 71–75.
- Taylor, A.O. y Bonner, B.A. 1967. Isolation of Phytochrome from the Alga *Mesotaenium* and Liverwort Plant *Physiol*. 42(6): 762-766.
- Terry, K.L., Hirata, J. y Laws, E.A. 1983. Light-limited growth of two strains of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerum* Bohlin: chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes. *J. exp. mar Biol. Ecol*. 68: 209-227

- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R. y Graham, I.A. 2002: Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61, 15–24.
- Tzoveni, I., De Pauw, N. y Sorgeloos, P. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic. (DHA) content of *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO). *Aquaculture International*, 5: 489–507.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. y Sorgeloos, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass rich in essential fatty acids: I. Effects of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216, 203-222.
- Um, B.H. y Kim, Y.S. 2009. Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology , *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15 (1): 1-7.
- Vácha, F. 1995. The role of oxygen in photosynthesis. *Photosynthetica* 31: 321-334.
- Vazhappily, R. y Chen, F. 1996. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 393–397.
- Villafañe, V.E. y Reid, F.M.H. 1995. Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton, p. 173: En: *Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E. C. y Sar E. (eds.), Universidad de Concepcion, Chile, 525 pp.
- Volkman, J. K. 1989. Fatty acids of microalgae used as feedstocks in aquaculture. En: Cambie, R C (Ed.). *Fats for The Future*. Chichester: Ellis Horwood, (18): 263-283 refs, illus.
- Walne, P. R. 1956. Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis L.* in the laboratory. *Fish. Invest., Lond. Ser. II*: 1-23.
- Wang, C-Y., Fu, C-C. y Liu, Y-C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *J Biochem Eng* 37: 21–25.
- Ward, O.P. y Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production , *Process Biochemistry*, 40 (12): 3627-3652.
- Whitelam, G.C. y Halliday, K.J., [Eds.], 2007. *Light and Plant Development*, Blackwell Publishing. 344 pp.

- Whyte, J.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231–241.
- Wikfors, G.H. y Patterson, G.W. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. *Aquaculture* 123, 127–135.
- Wikfors, G.H., Patterson, G.W., Ghosh, P., Lewin, R.A., Smith, B.C. y Alix, J.H. 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture* 143, 3–4.
- Wikfors, G.H. y Ohno, M. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol.* 37, 968–974.
- Wilde, F. D. y Gibbs, J. 1998. Turbidity, U. S Geological survey, TWRI Book 9, No. 4: chapter 6.7.
- Williams, P.J. B. y Jenkinson, N.W. 1982. A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol. Oceanogr.*, 27 (3): 576–584.
- Winkler, L.W. 1888. Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 21: 2843–2855.
- Wozniak, B. y Dera, J. 2000. Luminescence and photosynthesis of marine phytoplankton - a brief presentation of new results. *Oceanologia* 42: 137-156.
- Yanagi, T., Takita, S., Tanaka, M., Higuchi, T., Ushida, Y. y Watanabe, T. 1996. Development of plant growth apparatus using blue and red LED as artificial light source. *Acta Hort. (ISHS)*, 440: 111-116.
- You, T. y Barnett, S.M. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*. 19(3): 251-258.
- Zapata, M. y Garrido, J.L. 1997. Occurrence of phytylated chlorophyll c in *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) and *Isochrysis* aff. sp. (clone T. ISO) (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 33: 209-214.
- Zhang, Z., Moo-Young, M. y Chisti, Y. 1996. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Adv.*, 14: 401–436.

Zhu, C.J., Lee, Y.K. y Chao, T.M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) TK1. J. Appl. Phycol. 9:451-457.