

Tesis defendida por

Angelita Viridiana Rivera Talamantes

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elena Tchaikina Kolesnikova
Director del Comité

Dr. Mikhail Shlyagin
Miembro del Comité

Dr. Víctor Ruiz Cortés
Miembro del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dr. Emiliano Terán Bobadilla
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador del posgrado
en Óptica

Dr. Jesús Favela Vara
Director
de Estudios de Posgrado

Abril de 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA



Programa de posgrado en ciencias
en Óptica

Propiedades ópticas de la microalga *Porphyridium cruentum* en diferentes etapas de
crecimiento

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Angelita Viridiana Rivera Talamantes

Ensenada, Baja California, México,

2014

Resumen de la tesis de Angelita Viridiana Rivera Talamantes, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Propiedades ópticas de la microalga *Porphyridium cruentum* en diferentes etapas de crecimiento

Resumen aprobado por:

Dra. Elena Tchaikina Kolesnikova

Director de Tesis

Se presenta un estudio experimental de las propiedades ópticas de la microalga roja *Porphyridium cruentum*. Así como con otros organismos que realizan el proceso de fotosíntesis, la luz juega un papel fundamental en el ciclo de vida de la microalga y es el factor que promueve y limita el crecimiento de las colonias de fitoplancton. Los cultivos de la microalga pasan por varias fases, entre ellas la de adaptación, exponencial, lineal y desaceleración. En este trabajo, se estudiaron las propiedades ópticas de los cultivos de microalgas durante estas fases, monitoreando la densidad celular y la tasa de crecimiento específico de los cultivos. Se realizaron mediciones de las secciones transversales de absorción, esparcimiento y extinción, así como el factor de anisotropía. La concentración de clorofila *a* y carotenoides fue estudiada durante todo el periodo del crecimiento.

Palabras Clave: ***Porphyridium cruentum*, esparcimiento, absorción, extinción, carotenoides y clorofila a.**

Abstract of the thesis presented by Angelita Viridiana Rivera Talamantes, as a partial requirement to obtain the Master of Science in Optics with orientation in Optoelectronics.

Optical properties of the algae *Porphyridium cruentum* at different stages of their growth

Abstract approved by:

Dra. Elena Tchaikina Kolesnikova

Director de Tesis

We have present an experimental study of the optical properties of the red microalga *Porphyridium cruentum*. As with other organisms that perform photosynthesis, light plays a key role in the life cycle of microalgae and is the factor that promotes and limits the growth of the microalgae. The cultures go through different growing phases, among which are the adaptation, exponential, linear and stationary phases.

In this work, we studied the optical properties of microalgae culture during these stages, monitoring the cell density and the specific growth rate of the culture. Measurements of the cross sections of absorption, scattering and extinction, and the anisotropy factor are presented. The concentration of chlorophyll a and carotenoid was estimated during the different phases of growth.

Keywords: ***Porphyridium cruentum*, scattering, absorption, extinction, carotenoids and chlorophyll a**

A mi familia que siempre me ha apoyado en todas las decisiones que he tenido que tomar, en particular a mi novio Antonio que me ha mostrado su amor.

Agradecimientos

A mis padres Carlos y Francisca por su apoyo económico y moral, en el tiempo que duro la maestría. A mis hermanos Carlos, Jesús y Lorenzo, por su apoyo, cariño y motivación. A mis abuelos Carlos, Lorenzo y Zenaida que me motivaron a alcanzar mis metas. A mi novio Antonio por su ayuda incondicional, su paciencia y cariño. Y a mis amigos Liliana, Eder, Ivan, Anna, Erick, Marco Antonio, Gaspar y Alma, por apoyarme, hacerme reír y molestarme diariamente.

A los investigadores, compañeros y personal del Departamento de Óptica, gracias por su apoyo, consejos y enseñanza.

Al CONACyT por su apoyo económico.

Contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xii
1. Introducción	1
1.0.1 Descripción del tema	1
1.0.2 Contenido de la tesis	6
2. Antecedentes	7
3. Caracterización biológica de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	18
3.1 Inoculación y cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	18
3.2 Conteo celular	21
3.2.1 Cálculo de tasa de crecimiento y producción de células diarias	25
3.3 Extracción de pigmentos	26
3.3.1 Determinación de la concentración de clorofila <i>a</i> y carotenoides por el método espectroscópico	27
3.4 Resultados	30
3.4.1 Curva de crecimiento	30
3.4.2 Concentración de pigmentos	31
4. Caracterización óptica de <i>Porphyridium cruentum</i>	35
4.1 Secciones transversales de absorción, extinción y esparcimiento . . .	35
4.1.1 Arreglos experimentales para la medición de secciones transversales de absorción y esparcimiento	37
4.2 Factor de anisotropía de <i>Porphyridium cruentum</i>	40
4.2.1 Descripción del arreglo experimental	45
4.3 Análisis de esparcimiento simple y múltiple	47
4.4 Cálculo de la incertidumbre en la medición del factor de anisotropía	49
4.5 Resultados	50
4.5.1 Secciones transversales de extinción, absorción y esparcimiento	51
4.5.2 Factor de anisotropía	56

Contenido

	Página
5. Discusión y conclusiones	59
5.1 Discusión	59
5.2 Conclusiones	65
6. Trabajo a futuro y recomendaciones	71
6.1 Trabajo a futuro	71
6.2 Recomendaciones	71
Referencias bibliográficas	73

Lista de Figuras

Figura	Página
1	Microalga unicelular <i>Porphyridium cruentum</i> 2
2	Diferentes formas de cultivo de microalgas. (a) Cultivo de algas en fotobiorreactores tubulares. (b) Cultivo de algas en fotobiorreactores planos. (c) Cultivo de algas en sistemas abiertos. (Tomado de Benavente-Valdés <i>et al.</i> , 2012, p. 1). 4
3	Secciones transversales de absorción (Ca), esparcimiento (Cs) y extinción (Ce) (Terán, 2010, p. 94). 8
4	Espectros de absorción de extractos de cloroformo y la suspensión de células de <i>Parietochloris incisa</i> crecido a $1.24 Wm^{-2}$. (a) Cultivo complementado con nitrógeno: 1, extracto total; 2, clorofila <i>a</i> ; 3, clorofila <i>b</i> ; 4, espectro residual después de la resta de 2 y 3; 5, espectro de suspensión de células. Los espectros 1 y 5 se normalizan a 666 y 676nm, respectivamente. (b) Efecto de la deficiencia de nitrógeno en los espectros de absorción normalizada de extractos de células. Recuadro: sus espectros de diferencia. Los números indican el tiempo del período de cultivo en día. STD: espectro de desviación estándar para todas las muestras cultivadas en ausencia de nitrógeno (Merzlyak <i>et al.</i> , 2007, p. 837). 9
5	Los valores espectrales para el coeficiente de absorción específico de la clorofila <i>a</i> medido para células intactas ($a_{sus}(\lambda)$, línea sólida), el coeficiente de absorción específico computarizado para una suspensión acuosa hipotética de células ($a_{sal}(\lambda)$, línea punteada), y las mediciones después de la extinción con acetona ($a_{ext}(\lambda)$, línea discontinúa) (Bricaud <i>et al.</i> , 1988, p. 855). 11
6	Espectros de absorción corregidos por partícula. (a) Espectro de absorción de <i>Platymonas suecica</i> . (b) Espectro de absorción de <i>Hymenomonas elongata</i> . (c) Espectro de absorción de <i>Chaetoceros protuberans</i> (Hoepffner y Sathyendranath, 1991, p. 14). 12
7	Espectro de reflectancia de <i>Chlorophyta</i> con la concentración total de clorofila II: experimental (a) de 0.5 a $60 \frac{\mu g}{l}$; experimental (b) de 34 a $439 \frac{\mu g}{l}$. Espectro de reflectancia (c) y coeficiente de atenuación relativa de <i>Chlorophyta</i> . Concentraciones de clorofila II en el rango de 12.7 a $58.3 \frac{\mu g}{l}$ (Gitelson <i>et al.</i> , 1999, p. 348). 13

Lista de Figuras

Figura		Página
8	Coefficientes de absorción y esparcimiento para la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (Hannis, 2013, p. 348).	14
9	Típica curva de crecimiento de microalgas en cultivos por loteo sin recambio de medio.	15
10	Esporcimiento y absorción de una onda incidente al traspasar un medio no absorbente.	16
11	Esporcimiento de la luz por una partícula.	17
12	Esterilización de agua en autoclave.	19
13	Cultivos de <i>Porphyridium cruentum</i> en tres matraces Erlenmeyer. . . .	19
14	Instrumentos utilizados para contar células. (a) Hematocitómetro o cámara de Neubauer. (b) Retícula de conteo	22
15	Forma correcta de utilizar el hematocitómetro. (a) Muesca y zona de conteo en el hematocitómetro. (b) Forma de colocar la pipeta para colocar la muestra.	22
16	Consideraciones de las posiciones en las que se encuentran las células en las cuadrícula, para el conteo de células utilizando la retícula.	23
17	Esquema de las cuadrícula utilizada en el conteo celular (hematocitómetro).	24
18	Ejemplos de las diluciones del medio para obtener diferentes concentraciones de células.	24
19	Filtrado de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> . (a) Ejemplo de filtrado de las muestras. (b) Porta filtros para jeringa. (c) Filtros de fibra de vidrio.	27
20	Curva de crecimiento promedio de <i>Porphyridium cruentum</i> (día 0-10). . .	30
21	Tasa de crecimiento específico (μ) de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> (día 1-10).	31
22	Espectros de absorbancia de las muestras de <i>Porphyridium cruentum</i> para los días 3 y 8.	32

Lista de Figuras

Figura		Página
23	Concentración de pigmentos de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> días 0 – 10. Concentración de clorofila <i>a</i> (barras color azul). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).	33
24	Concentración de pigmentos por célula de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> días 0 – 10. Concentración de clorofila <i>a</i> (barras color azul). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).	34
25	Esquema de propagación de luz al pasar por un medio con una partícula.	36
26	Esquema del arreglo experimental para la medición de la sección transversal de absorción; incluye una fuente de iluminación (a), dos diafragmas (<i>d1</i> y <i>d2</i>), una lente (L), una esfera integradora (c), un espectrómetro (e) y una computadora.	38
27	Esquema del arreglo experimental para la medición de la sección transversal de extinción; incluye una fuente de iluminación (a), dos diafragmas (<i>d1</i> y <i>d2</i>), una montura para la fibra óptica (c), un espectrómetro (e) y una computadora.	39
28	Comparación entre los valores de <i>f</i> y <i>b</i> con la aproximación $x \pm 1$ y con la función de fase de Henyey Greenstein (Ilustración tomada de Benavente-Valdés <i>et al.</i> , 2012, p. 89).	44
29	Diagrama del arreglo experimental para la medición del factor de anisotropía, que incluye; un láser Helio Neón $\lambda = 632.8nm$, una lente, dos espejos móviles, cinco espejos fijos, una esfera integradora y un espectrómetro.	46
30	Las diluciones en las mediciones de secciones trasversales de absorción y esparcimiento. (a) Es el $\ln(\frac{P_a}{P_o})$ respecto al número de células. (b) Muestra el $\ln(\frac{P_e}{P_o})$ respecto al número de células.	49
31	Sección transversal de extinción días 0-10 para cultivos de <i>Porphyridium cruentum</i>	51
32	Sección transversal de absorción días 0-10 para cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	52
33	Variaciones de sección transversal de absorción en el rango de 650nm a 700nm y para $\lambda = 720nm$, del día 0 al día 10 para cultivos de <i>Porphyridium cruentum</i>	53

Lista de Figuras

Figura		Página
34	Absorción normalizada por la integral en el intervalo de 450 – 700nm, de los días 0 – 10 para cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	54
35	Sección transversal de esparcimiento días 0-10 para un cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	55
36	Variaciones de sección transversal de esparcimiento en el rango de 650nm a 700nm, del día 0 al día 10 para cultivos de <i>Porphyridium cruentum</i>	56
37	Penetración de la luz a través de las muestras de <i>Porphyridium cruentum</i> para las longitudes de onda siguientes: 495nm, 550nm y 660nm, en los días cero, cuatro y ocho.	57
38	Factor de anisotropía del día cero al diez para cultivos de <i>Porphyridium cruentum</i>	58
39	Curva representativa de crecimiento consiste en las fases de adaptación (I), exponencial (II), lineal (III), desaceleración (IV), estacionario (V) y de muerte (VI), donde t_{lag} es el tiempo de transferencia de la fase de adaptación a la fase exponencial, en el que la concentración de biomasa es Cx_0 , t_{l_0} es el tiempo de transferencias de crecimiento a partir del tiempo de crecimiento exponencial a la fase lineal, donde la concentración de biomasa es Cx_{l_0} , t_{l_s} es el tiempo de transferencias de crecimiento a partir de la fase lineal a la fase de desaceleración, t_{s_0} es el tiempo crítico cuando la fase estacionaria inicia, t_{d_0} es el tiempo critico cuando (Levert y Xia, 2001, p. 362).	60
40	Curva de crecimiento de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> con curvas de ajuste para las fases exponencial y lineal.	60
41	Curva de crecimiento de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i> creada a partir de los datos de crecimiento de la tabla 5 (línea roja ajuste para la fases exponencial, línea negra ajuste para la fases lineal).	62
42	Espectros de absorción de los pigmentos característicos de las microalgas	63

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Concentraciones de nutrientes en un medio "f".	20
2	Valores promedio de la concentración de pigmentos, cantidad de biomasa (células/ml $\times 10^6$) y variables de población para <i>Porphyridium cruentum</i>	32
3	Dilución y número de células	48
4	Valores promedio del factor de anisotropía en $\lambda = 632.8nm$	58
5	Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivados en 100ml con medio "f/2". Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).	61

Capítulo 1

Introducción

1.0.1 Descripción del tema

Las microalgas son organismos unicelulares de tamaño microscópico (de menos de una μm a algunos centímetros), que al igual que las plantas son capaces de sintetizar las sustancias necesarias para su nutrición, sin necesidad de otro ser vivo. Para poder sintetizar las sustancias, las microalgas utilizan el proceso de fotosíntesis. En este proceso la energía luminiscente es transformada en energía química. Las microalgas utilizan los pigmentos para absorber fotones, la energía de estos fotones absorbidos se utiliza para la síntesis de sustancias (Darley, 1987).

Existen diversas clases de microalgas que se distinguen por su pigmentación, presencia o ausencia de flagelos (número de flagelos, longitud y punto de inserción), composición de la pared celular y tipo de producto fotosintético almacenado (Darley, 1987).

Son múltiples las aplicaciones en las que se emplean distintas especies de microalgas debido a su gran potencial. Una de las especies de gran aplicación acuícola y biotecnológica es la microalga *Porphyridium cruentum* que pertenece a la clase *Rodophyceae* (alga roja). Estas microalgas se diferencian por tener un color rojizo, y son de tamaño microscópico, la mayoría de ellas son de agua salada, aunque también son comunes en agua dulce.

Porphyridium cruentum (ver figura 1) es una microalga unicelular de forma esférica de 6 a 16 micrómetros de diámetro, posee una pared celular con polisacáridos sulfatados,

además produce polisacáridos extra celulares. El color rojo característico de las algas *Rodophyceae*, se debe a dos pigmentos accesorios ficoeritrina y ficocianina. En el caso del *Porphyridium cruentum*, está presente la ficocianina, los carotenoides y la clorofila *a*. Estos pigmentos tienen la función de ser una especie de antena, cuya labor es atrapar a los fotones necesarios para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis.

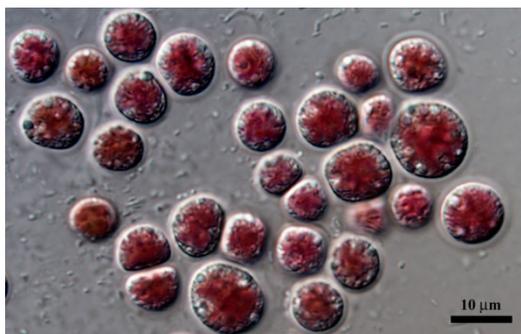


Figura 1. Microalga unicelular *Porphyridium cruentum*.

Muchos estudios acerca de *Porphyridium cruentum* se han realizado debido a sus características biológicas y su carácter multifacético, ya que es empleada en diversas áreas como: la acuicultura, biomedicina, bioquímica y cosmética entre otras. En el área de la medicina se han realizado estudios sobre las cualidades inmunomoduladoras. Por ejemplo, en el estudio realizado por Abdala-Díaz *et al.* (2010), se mostró un aumento en la necrosis tumoral alfa, de interleucina 6 y de óxido nítrico, en presencia de diferentes concentraciones de polisacáridos.

En lo que respecta al área bioquímica, el pigmento B ficoeritrina que tiene propiedades de tinte natural, es usado en alimentos y en la industria cosmética. Este pigmento presenta características de fluorescencia e intenso color rosa, motivo por el cual es empleado para desarrollar biosensores (Benavides y Rito-Palomares, 2004; Bermejo Román *et al.*, 2002). En la cultura asiática se utiliza la biomasa de varias

especies de microalgas, para elaborar alimentos debido a su gran concentración de nutrientes; ácidos grasos omega tres, omega seis, amino ácidos esenciales y carotenoides. Existen microalgas que tienen altos contenidos de fibra, esto ha sido un argumento contra el uso de microalgas en la alimentación humana (Becker, 2007). Sin embargo como los minerales son biodisponibles y no hay factores tóxicos o anti nutricionales detectables, la biomasa del *Porphyridium cruentum* podría ser utilizada para propósitos nutricionales, debido a la cantidad y diversidad de nutrientes que contiene. Además, la composición de la biomasa puede ser modificada por medio de variables operativas, principalmente mediante el uso de tiempos de residencia cortos para obtener EPA (ácido icosapentaenoico) y enriquecimiento de proteína (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000).

Los compuestos biológicos polisacáridos, proteínas, carbohidratos, ficoeritrina, lípidos, carotenoides entre otros más, se obtienen mediante el cultivo de *Porphyridium cruentum* en estanques abiertos o en fotobiorreactores (ver figura 2). En los cultivos abiertos, seleccionan condiciones que favorecen el crecimiento de las algas, el problema es el riesgo de crecimiento de microorganismos contaminantes, además del poco control de operación que permiten estos sistemas de cultivo. Emplear el sistema abierto, no permite el cultivo de algas que requieren condiciones que impidan la proliferación de otros microorganismos contaminantes. La manufactura de los productos de algas de alto valor, a partir de cepas que no se puede mantener en estanques abiertos requiere de sistemas cerrados. Una de estas cepas es la microalga *Porphyridium cruentum*, que ha sido referencia como una fuente potencial de varios productos químicos de alto valor comercial.

Múltiples factores en el ambiente como la temperatura, salinidad, nutrientes y la luz, deben cuidarse durante el crecimiento de cualquier cultivo de microalgas. Las

variaciones de estos factores crean diferentes composiciones bioquímicas a lo largo del proceso de crecimiento (Reboloso Fuentes *et al.*, 1999).

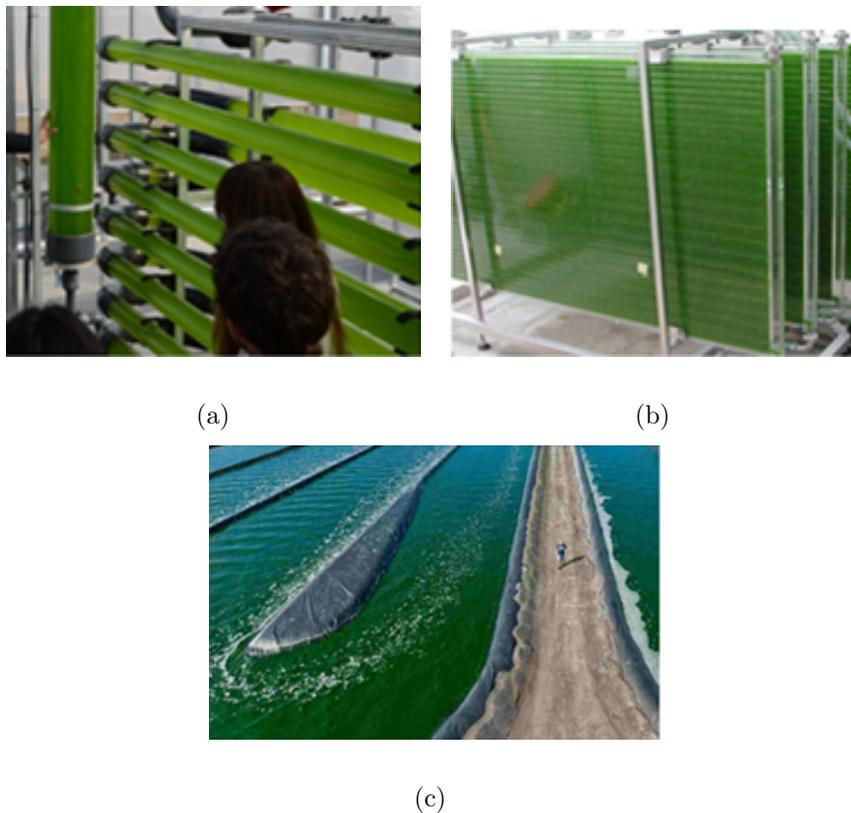


Figura 2. Diferentes formas de cultivo de microalgas. (a) Cultivo de algas en fotobiorreactores tubulares. (b) Cultivo de algas en fotobiorreactores planos. (c) Cultivo de algas en sistemas abiertos. (Tomado de Benavente-Valdés *et al.*, 2012, p. 1).

Estos componentes bioquímicos, son distintos en función de la fase de crecimiento y las condiciones del ambiente a las que se cultivan las microalgas, se requiere conocer las características óptimas para cada una de estas fases, y de esta forma obtener cosechas con mayor abundancia. La luz desempeña un factor fundamental, es un elemento que promueve o limita el crecimiento de las microalgas en función de la intensidad luminosa. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta hasta un punto de saturación. Cuando el crecimiento se encuentra en la fase estacionaria o punto máximo de crecimiento, la densidad celular presenta un decremento al igual

que la intensidad luminosa que llega a las microalgas, por efectos de auto sombreado (Bohne y Linden, 2002). Algunos trabajos de investigación sugieren que un aumento en la concentración de carotenoides bajo condiciones de estrés representa un mecanismo que protege a las células del daño ocasionado por la luz (Niyogi, 1999; Ledford y Niyogi, 2005). La intensidad y el régimen de la iluminación varían con el género de microalga. Para cultivar microalgas se suele emplear distintos tipos de iluminación; luz solar, artificial o ambas (Benavente-Valdés *et al.*, 2012).

Las propiedades ópticas de las suspensiones microalgas dependen del tamaño y forma de las células que interactúan con la irradiancia; índices de refracción de las estructuras celulares internas y externas, y el contenido general, la distribución, y la concentración local de moléculas que absorben la luz dentro de la célula (Osborne y Raven, 1986; Naqvi *et al.*, 2004). La absorción de la luz por las suspensiones que contienen microalgas con tamaños superiores a las longitudes de onda de la luz incidente está fuertemente afectada por efectos de esparcimiento. Debido a la estructura celular, especialmente en las bandas de absorción del pigmento, se produce un decaimiento del espectro, y la cantidad de luz absorbida se reduce en comparación a la misma cantidad de pigmento en una solución o una partícula pigmentada. El análisis cualitativo y cuantitativo de las suspensiones de células pigmentadas se ve obstaculizado debido a la fuerte contribución del esparcimiento selectivo y no selectivo. El esparcimiento no selectivo surge de la interacción de luz con estructuras incoloros y presencia de dependencia relativamente uniforme a una longitud de onda (Osborne y Raven, 1986; Naqvi *et al.*, 2004), el esparcimiento selectivo se presenta en las estructuras celulares altamente pigmentadas (por ejemplo membranas tilacoides de los cloroplastos) cuando el índice de refracción cambia bruscamente con la longitud de onda (Naqvi *et al.*, 2004).

Es evidente el papel que desempeña la luz durante todo el proceso de crecimiento,

motivo por el cual proponemos el estudio detallado del esparcimiento y absorción de la luz durante el periodo de crecimiento y analizar cómo se relacionan con la concentración de pigmentos. Por este motivo en esta tesis se caracterizaron la sección transversal de absorción, la sección transversal de esparcimiento, la sección transversal de extinción y el factor de anisotropía.

1.0.2 Contenido de la tesis

La tesis consta de seis capítulos. El primer capítulo es la introducción la cual contiene una descripción del tema de la tesis, la justificación y el objetivo. El segundo capítulo presenta básicamente en que consisten los parámetros que serán investigados así como algunos trabajos relacionados con el trabajo de tesis. El tercer capítulo contiene la metodología empleada para la medición de las características poblacionales del cultivo (número de células por mililitro diario, tasa de crecimiento diario y la producción de células diaria), la concentración de clorofila *a* y carotenoides diaria y por último la concentración de clorofila *a* y carotenoides por célula diaria. Además contiene los resultados que se obtuvieron de las propiedades biológicas de los cultivos. El capítulo cuatro contiene la metodología utilizada para la medición de las secciones transversales de absorción, extinción y esparcimiento, así como el factor de anisotropía. Los arreglos experimentales para la medición de los parámetros antes mencionados. Además contiene los resultados. En el capítulo cinco se encuentran la discusión conclusion con base en los resultados de la comparación entre los resultados ópticos y biológicos. Por último en el capítulo seis se encuentran las recomendaciones y el trabajo que se puede realizar a partir del nuestro.

Capítulo 2

Antecedentes

En años recientes ha aumentado el interés hacia las microalgas, gracias a sus características útiles en numerosos campos como la medicina, bioquímica, cosmetología, acuicultura, agricultura, nutrición y fuentes alternativas de energía entre otras más. Motivados por las características de las microalgas, existen trabajos en los que se realizaron caracterizaciones ópticas y biológicas de algunas especies de microalgas particulares como los realizados por Bricaud *et al.* (1988), Hoepffner y Sathyendranath (1991), Gitelson *et al.* (1999), Merzlyak *et al.* (2007), Terán *et al.* (2010), y el trabajo de tesis realizado por Hannis (2013) entre otros.

En el trabajo realizado por Terán *et al.* (2010), se realizó la caracterización de *Symbiodinium kawagutii*, una microalga que vive dentro del esqueleto de los corales pétreos, se midieron los coeficientes de absorción, esparcimiento, factor de anisotropía, transmitancia y reflectancia.

La figura 3 muestra los resultados de la medición de las secciones transversales de absorción, esparcimiento, y extinción, que fueron empleadas para determinar los coeficientes de absorción y esparcimiento. Debido a que el pico de absorción de la clorofila *a* determina la tasa de producción de la fotosíntesis escogemos los valores de la sección transversal de absorción seleccionados son $38\mu m^2$ y $65\mu m^2$ para la sección transversal de esparcimiento cuando $\lambda = 675nm$. Con estos datos, encontraron que los valores de los coeficientes de absorción (μ_a) y esparcimiento (μ_s) para un medio bien pigmentado ($\eta = 106cel/ml^2$) de espesor $d = 50\mu m$ para una capa está definido por:

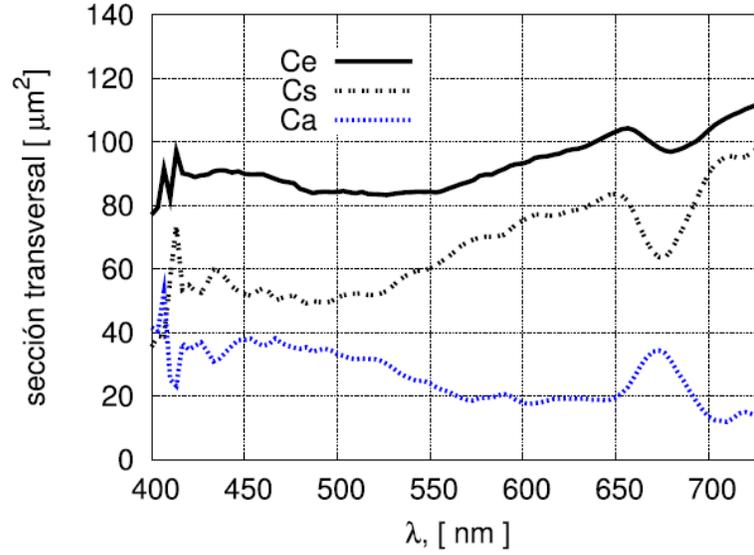


Figura 3. Secciones transversales de absorción (Ca), esparcimiento (Cs) y extinción (Ce) (Terán, 2010, p. 94).

$$\mu_a = \frac{\eta}{d} C_a = 154 \text{ cm}^{-1} y \mu_s = \frac{\eta}{d} C_s = 162 \text{ cm}^{-1}. \quad (1)$$

Estos cálculos les permitieron estimar la fracción de luz absorbida por la capa que contiene a las algas fotosintéticas y con esta información, es posible calcular la fracción de luz absorbida por cada microalga. Suponiendo que se trata de un problema lineal, esto da información sobre el ambiente lumínico relativo en el que viven las microalgas y su modificación debido a la estructura del coral.

El trabajo realizado por Merzlyak *et al.* (2007), consistió en investigar los efectos de la deficiencia de nitrógeno sobre la ultra estructura, pigmentos, lípidos y propiedades ópticas (espectro de absorción) de la microalga *Parietochloris incisa* en algunas etapas del ciclo de vida.

En la figura 4 se aprecian los resultados de la medición de la absorción de suspensión de células, de la extracción de pigmentos en cloroformo y el efecto de la deficiencia de nitrógeno en el espectro de absorción de la extracción de pigmentos en cloroformo.

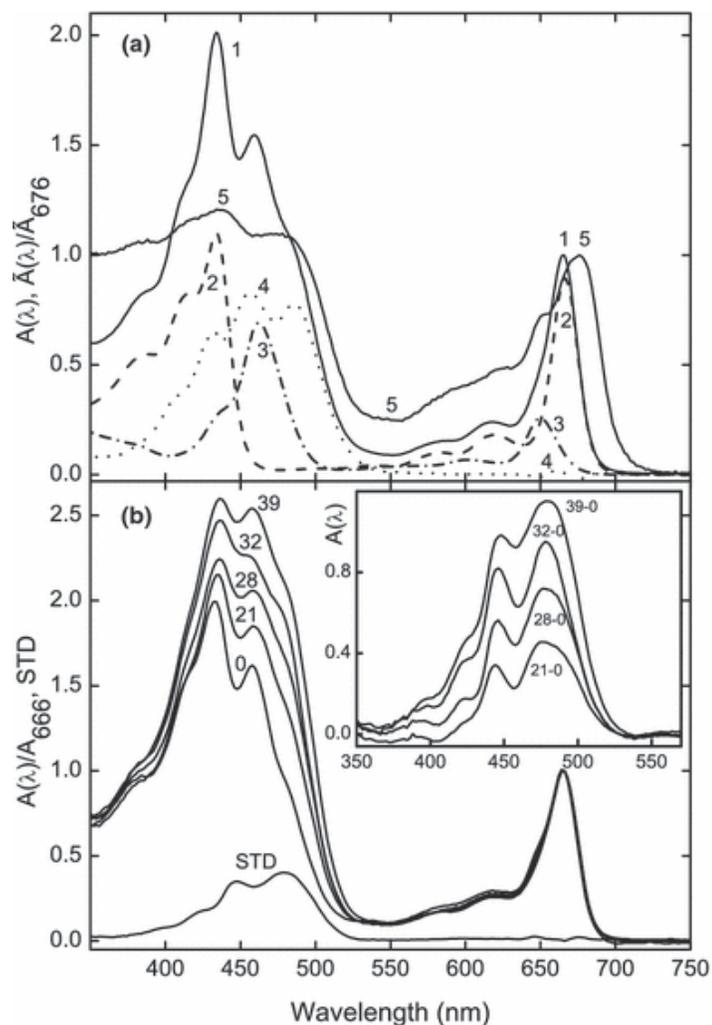


Figura 4. Espectros de absorción de extractos de cloroformo y la suspensión de células de *Parietochloris incisa* crecido a 1.24 Wm^{-2} . (a) Cultivo complementado con nitrógeno: 1, extracto total; 2, clorofila *a*; 3, clorofila *b*; 4, espectro residual después de la resta de 2 y 3; 5, espectro de suspensión de células. Los espectros 1 y 5 se normalizan a 666 y 676nm, respectivamente. (b) Efecto de la deficiencia de nitrógeno en los espectros de absorción normalizada de extractos de células. Recuadro: sus espectros de diferencia. Los números indican el tiempo del período de cultivo en día. STD: espectro de desviación estándar para todas las muestras cultivadas en ausencia de nitrógeno (Merzlyak *et al.*, 2007, p. 837).

Los resultados del estudio de Merzlyak *et al.* (2007) indican que a pesar de la óptica complicada en los sistemas de turbias y de absorción de luz, una información valiosa sobre el estado de nutrición y el estado fisiológico de las microalgas se puede obtener del resultado de la espectrofotometría de absorción no destructiva. Los datos presentados en este estudio muestran que las proporciones de absorbancia, así como los

espectros derivados de suspensiones de células, presentan cambios considerables durante la inanición de nitrógeno y en la recuperación, lo cual podría servir como indicador de la deficiencia de nitrógeno en *Parietochloris incisa*. Por otra parte, los resultados del estudio sugieren que bajo ciertas circunstancias es factible controlar la acumulación de ácido araquidónico por análisis espectrofotométrico sencillo, evitando un análisis cromatográfico tedioso y que consume mucho tiempo. En conclusión, debe considerarse que la deficiencia nutricional demostró ser un modelo útil para la investigación del efecto de los pigmentos en las propiedades ópticas de las células.

Las microalgas que se caracterizaron en el trabajo de Bricaud *et al.* (1988) fueron *Pavlova pinguis*, *Pavlova lutheri*, *Prymnesium parvum*, *Chaetoceros curvisetum*, *Chaetoceros lauderi*, *Dunaliella salina*, *Porpyridium cruentum* y *Synechococcus* sp., en este estudio se midieron los coeficientes de absorción de la clorofila *a* en células vivas y clorofila *a* extraída utilizando acetona durante la fase exponencial del crecimiento. La figura 5 muestra el resultado de coeficiente de absorción específico de la clorofila *a* en células intactas, para una suspensión hipotética de células y el coeficiente de extinción específico.

Como resultado de la investigación de Bricaud *et al.* (1988) se obtuvo que la influencia de la forma de la célula y la estructura interna no son cruciales en la atenuación y el esparcimiento. De la comparación entre la teoría y el experimento, el índice de refracción puede ser deducido para el fitoplancton. Este índice debe ser consistente con el contenido del agua y la composición del material seco de diferentes tipos de algas, y más sorprendente es la covariación con la concentración de clorofila *a* intracelular.

En el trabajo que realizaron Hoepffner y Sathyendranath (1991), se midieron los coeficientes de absorción de las microalgas *Platymonas suecica*, *Hymenomonas*

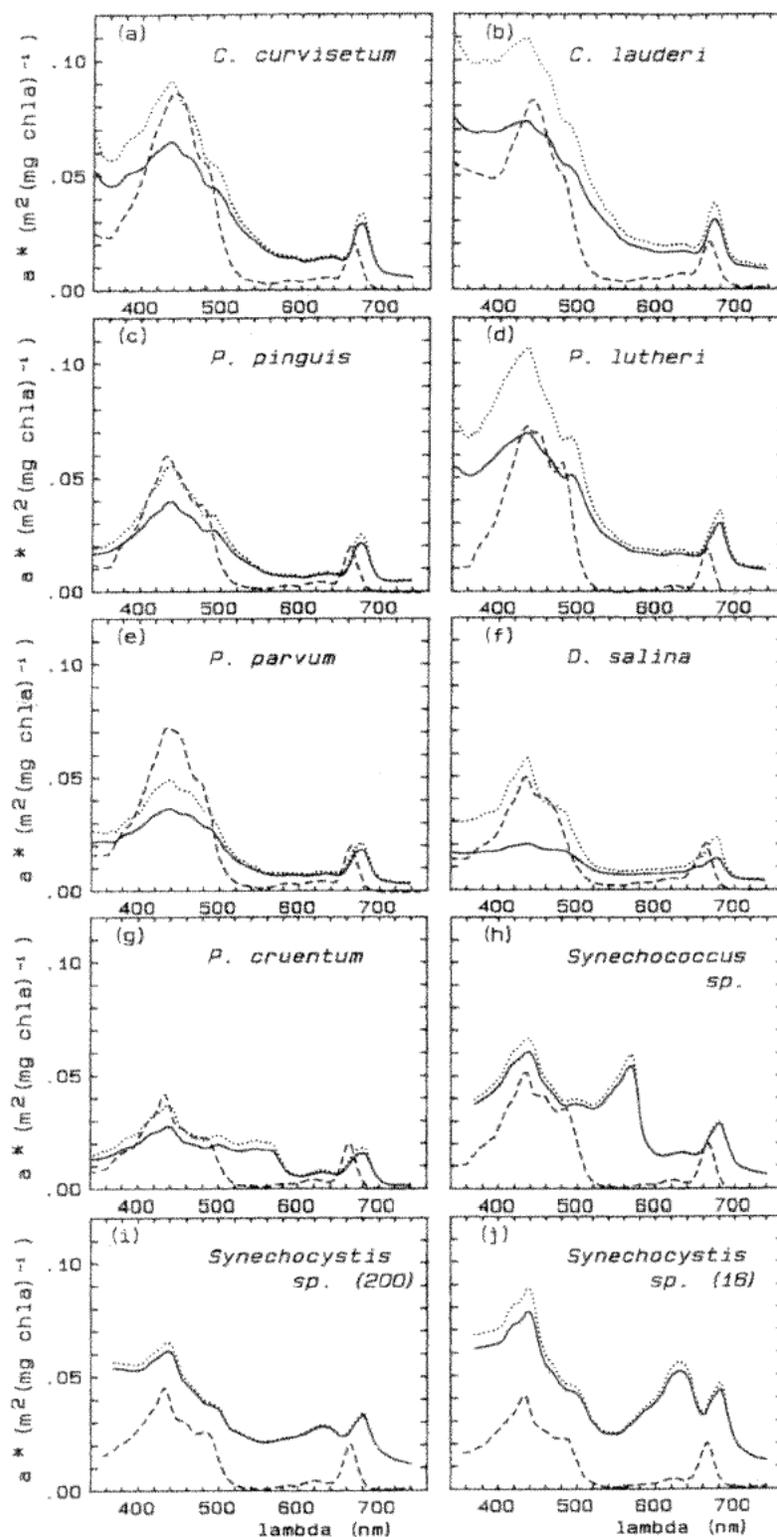


Figura 5. Los valores espectrales para el coeficiente de absorción específico de la clorofila a medido para células intactas ($a_{sus}(\lambda)$, línea sólida), el coeficiente de absorción específico computarizado para una suspensión acuosa hipotética de células ($a_{sal}(\lambda)$, línea punteada), y las mediciones después de la extinción con acetona ($a_{ext}(\lambda)$, línea discontinúa) (Bricaud *et al.*, 1988, p. 855).

elongata y *Chaetoceros protuberans*. La figura 6 muestra los espectros de absorción de las microalgas *Platymonas suecica*, *Hymenomonas elongata* y *Chaetoceros protuberans*.

El trabajo de Hoepffner y Sathyendranath (1991) demostraron que es posible obtener los espectros de absorción en vivo de las células de fitoplancton, con base en la suma de una docena de bandas de absorción Gaussianas. La correlación lineal de las diferentes alturas de los picos con las concentraciones de uno de cualquiera de los cuatro pigmentos principales en las muestras indica que el método ha tenido éxito en la separación de la absorción debido a cada pigmento.

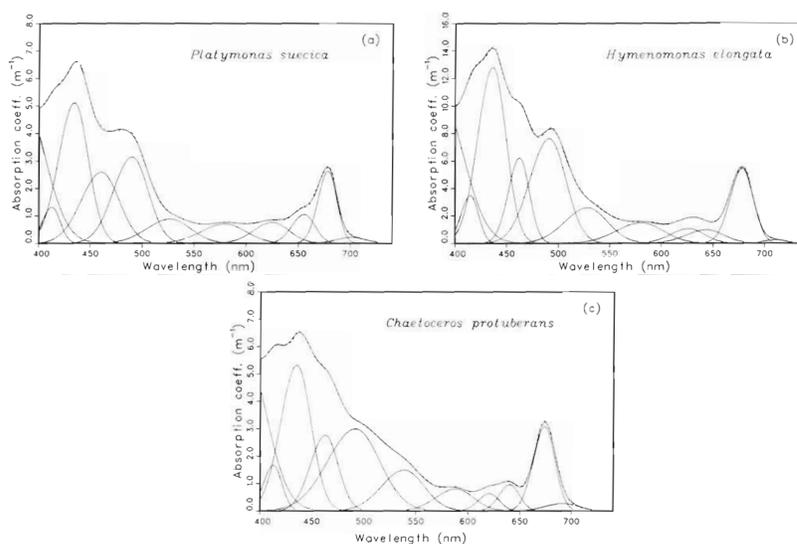


Figura 6. Espectros de absorción corregidos por partícula. (a) Espectro de absorción de *Platymonas suecica*. (b) Espectro de absorción de *Hymenomonas elongata*. (c) Espectro de absorción de *Chaetoceros protuberans* (Hoepffner y Sathyendranath, 1991, p. 14).

Gitelson *et al.* (1999) trabajo utilizando cultivos de *Chlorophyta*, particularmente un cultivo dominado por el alga *Chlorella* sp. y otro con *Chlorella* sp. con pocas de *Anikistrodemus* sp., *Pediastrum* sp., *Selenastrum* sp. y una *euglenoidea* no identificada, se extrajo la clorofila de los dos cultivos y se midieron reflectancia y coeficiente relativo de atenuación, utilizando diferentes concentraciones de clorofila.

La figura 7 muestra las mediciones de reflectancia y coeficiente de atenuación relativa

de *Chlorophyta*. Se encontraron varias características de reflectancia espectral común en todas las especies examinadas en el estudio: una disminución entre 440 y 500 nm, una disminución sobresaliente en torno a 670 nm, y picos prominentes en torno 570 nm y 700 nm. Encontraron que el aumento en la magnitud de un pico del infrarrojo cercano y el cambio en la posición hacia longitudes de onda más largas con el aumento de la concentración de clorofila *a* fue un rasgo común para todas las especies que estudiaron. Cuantitativamente las diferentes relaciones de la magnitud y la ubicación de las funciones de reflectancia espectral con la concentración de clorofila reflejaron diferentes propiedades ópticas de las algas (esparcimiento y absorción). Esto fue de utilidad para la caracterización taxonómica mediante teledetección (Gitelson *et al.*, 1999).

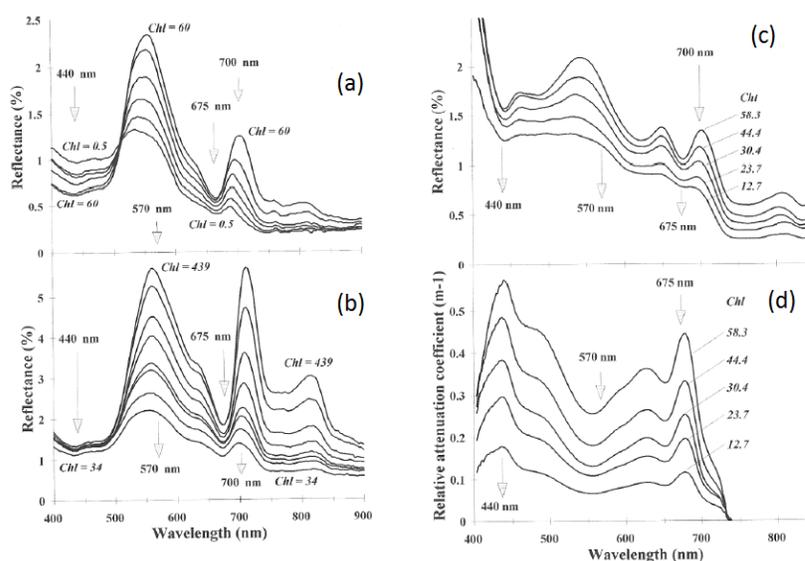


Figura 7. Espectro de reflectancia de *Chlorophyta* con la concentración total de clorofila II: experimental (a) de 0.5 a $60 \frac{\mu g}{l}$; experimental (b) de 34 a $439 \frac{\mu g}{l}$. Espectro de reflectancia (c) y coeficiente de atenuación relativa de *Chlorophyta*. Concentraciones de clorofila II en el rango de 12.7 a $58.3 \frac{\mu g}{l}$ (Gitelson *et al.*, 1999, p. 348).

Por último en el trabajo de Hannis (2013) se midieron los coeficientes de absorción, extinción y esparcimiento de las microalgas de agua dulce y salada *Chlorella vulgaris*,

Ettlia Texensis, *Neochloris oleoabundans*, *Scenedesmus obliquus* y *Tetraselmis suecica*.

La figura 8 muestra los coeficientes de absorción y esparcimiento para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Con base en los resultados que obtuvo Hannis (2013), examinó el efecto de la forma de las partículas en la penetración de la luz a través de una muestra de algas. El propósito era determinar si existía una tendencia discernible, y si era así, si algún tipo de forma o factor podría ser determinada para un modelo futuro, para perfeccionar los fotobiorreactores relacionando los con formas específicas de las partículas. Si bien no obtuvo una tendencia concluyente, y por lo tanto no determinaron forma o factores explícitos, es posible alcanzar una mayor densidad óptica utilizando células más pequeñas y por lo tanto la penetración de la luz sera menor, aunque existen otros factores que contribuyen.

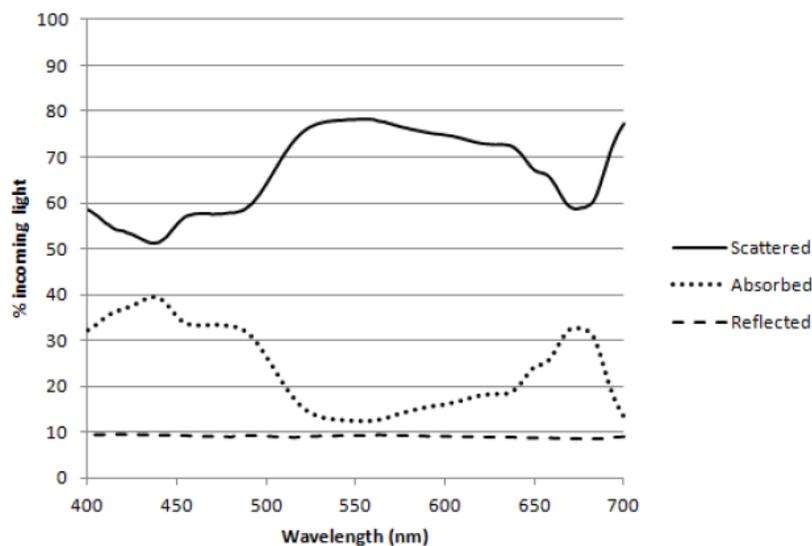


Figura 8. Coeficientes de absorción y esparcimiento para la microalga *Chlorella vulgaris* (Hannis, 2013, p. 348).

La caracterización óptica de las microalgas antes mencionada se realizó en una fase de crecimiento no indicada, sin embargo en el caso de algunas especies como

Porphyridium cruentum, las características y concentraciones de los materiales orgánicos que las forman varían en función de la etapa de crecimiento en que se encuentren (ver figura 9). Por lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización de la microalga *Porphyridium cruentum*, de la fase de adaptación hasta la fase de estacionaria (ver figura 9).



Figura 9. Típica curva de crecimiento de microalgas en cultivos por loteo sin recambio de medio.

Los parámetros ópticos de la microalga que serán caracterizados son; la sección transversal de absorción, la sección transversal de esparcimiento, la sección transversal de extinción y el factor de anisotropía. Para describir a estas secciones transversales ópticas partimos de una onda incidente (A) que pasa a través de una partícula (x) y llega hasta otro punto, en el que se encuentra un detector (B) (ver figura 10). La potencia óptica que incide en el detector en ausencia de esta partícula (P_a) es mayor a la potencia detectada en presencia de la partícula (P_p), es decir:

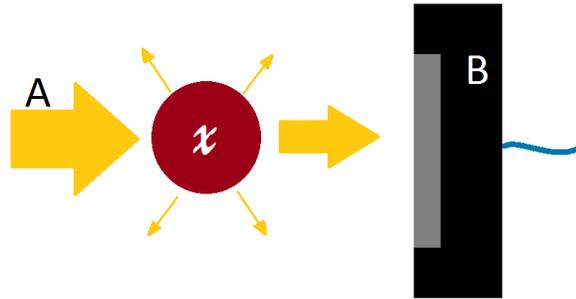


Figura 10. Esparcimiento y absorción de una onda incidente al traspasar un medio no absorbente.

$$P_p < P_a. \quad (2)$$

La potencia perdida (P_{per}) por interacción con la partícula es igual a la irradiancia incidente (I_o) entre una constante de proporcionalidad con unidades de área, esto es:

$$P_{per} = \frac{I_o}{C_{ex}}, \quad (3)$$

donde C_{ex} es la sección transversal de extinción, es decir el área efectiva que ve la luz. Esta sección transversal de extinción es la suma de la sección transversal de absorción (C_a) y la sección transversal de esparcimiento (C_{es}). Por lo tanto:

$$C_{ex} = C_a + C_{es}. \quad (4)$$

Definimos las secciones transversales de absorción y esparcimiento de la siguiente forma:

$$C_a = \frac{I_o}{P_{Ta}}, \quad (5)$$

$$C_{es} = \frac{I_o}{P_{Tes}}, \quad (6)$$

donde P_{Ta} es la potencia absorbida y P_{Tes} la potencia esparcida. Estas secciones transversales son características de cada partícula y dependen de varios factores; el medio en el que se encuentran suspendidas, el material del que están hechas y la orientación en la que se encuentren.

El factor de anisotropía (g), es la medida de la cantidad de luz dispersada hacia delante durante un único evento de esparcimiento. Para entenderlo mejor, imaginemos un haz de luz que es dispersado por una partícula, entonces la trayectoria que tenía se desvía en un ángulo θ , como se muestra en la figura 11. La componente de la nueva trayectoria que está alineada hacia delante se muestra de color rojo en la figura 11 como el $\cos(\theta)$. El ángulo de desviación promedio y el valor medio del $\cos\theta$ se definen como anisotropía. Además del ángulo de desviación (θ), también existe un ángulo de dispersión azimutal (ψ), sin embargo, es el ángulo de desviación ($\cos(\theta)$) el que repercute en la cantidad de luz retenida hacia delante.

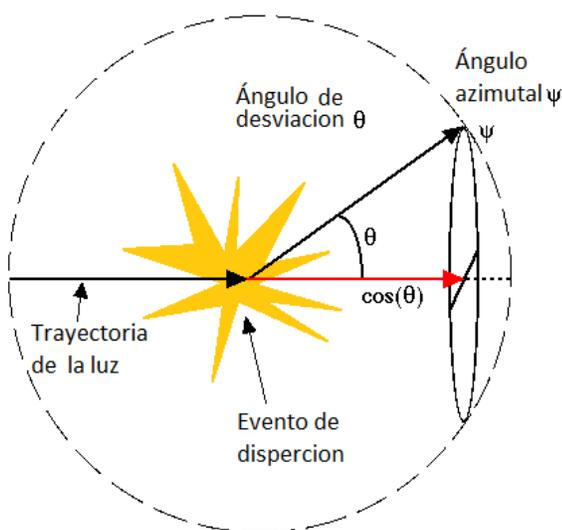


Figura 11. Esparcimiento de la luz por una partícula.

Capítulo 3

Caracterización biológica de la microalga *Porphyridium cruentum*

En este capítulo se presenta los métodos utilizados para evaluar el crecimiento del cultivo de *Porphyridium cruentum*; i) inoculación, ii) conteo celular, iii) características del medio en el que se encuentra la microalga y iv) características del ambiente en el que se desarrolla el cultivo. Además se describe la metodología empleada para la extracción de pigmentos de la microalga. Por último, se muestran los resultados de extracción de pigmentos y la caracterización de la curva de crecimiento.

3.1 Inoculación y cultivo de *Porphyridium cruentum*

El cultivo inicia mediante la inoculación empleando la cepa *Porphyridium cruentum* que se obtuvo de la colección, del cepario microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Para que cualquier cultivo de microalgas se desarrolle adecuadamente requiere un medio apropiado. El cultivo de *Porphyridium cruentum* se realizó en agua de mar que debe estar libre de cualquier otra especie de microalga o microorganismo. La desinfección y esterilización del agua marina se realiza en 3 pasos que se describen a continuación:

- Se filtra el agua empleando un sistema con 3 filtros; el primero con poro de $5\mu m$, el segundo de $1\mu m$ y por último un filtro de carbono activado.
- Una vez filtrada el agua se desinfecta pasándola por un tubo en la que es irradiada con luz ultravioleta.

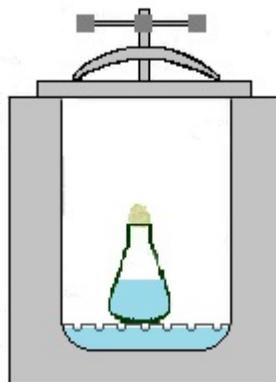


Figura 12. Esterilización de agua en autoclave.

- Por último, la esterilización del agua se hace colocándola dentro de un matraz Erlenmeyer con un tapón de algodón y se coloca dentro de una autoclave (ver figura 12), a una temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1.05 kg cm^{-2} de presión por 15 minutos.



Figura 13. Cultivos de *Porphyridium cruentum* en tres matraces Erlenmeyer.

Para iniciar el cultivo se colocó una concentración de 10 mililitros de la cepa, en los tres matraces con 150ml de agua de mar previamente esterilizada (ver figura 13). Para poder realizar comparaciones ente muestras, se utilizaron de tres matraces con igual cantidad de cepa y agua, además de asegurar el trabajo en caso de que alguno de ellos

se contaminara.

La tabla 1 presenta un listado de nutrientes necesarios para el crecimiento de las algas, la cantidad de cada uno de los nutrientes corresponde a 100ml de agua de mar. La concentración de nutrientes para los 150 ml de agua se calcula empleando como referencia el medio "f" (Guillard y Ryther, 1962), que se muestra en la tabla 1. Entonces para los 150 ml , se requieren $150\mu\text{l}$ de cada uno de los cinco nutrientes, por lo que en conjunto se agregan 0.75ml de nutrientes a cada matraz.

Tabla 1. Concentraciones de nutrientes en un medio "f".

Nutrientes	Cantidad de nutrientes para 100ml de medio
Nitratos	$100\mu\text{l}$
Fosfatos	$100\mu\text{l}$
Silicatos	$100\mu\text{l}$
Vitaminas	$100\mu\text{l}$
Metales traza	$100\mu\text{l}$

Una vez terminado el proceso de inoculación, se procede a realizar un conteo celular con una cámara nebulosa o hematocitómetro. El primer conteo se considera como el conteo del día cero (Cortés *et al.*, 2008). Una vez terminado el conteo se colocan los cultivos en un medio ambiente a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, iluminación constante con luz continua de $100\text{ }\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ proveniente de lámparas de luz blanca fría de 40 W . La temperatura e iluminación se mantuvieron constantes durante el crecimiento de la microalga.

3.2 Conteo celular

El conteo de número de células se realizó diariamente, del día cero al diez. Con base en el número de células por mililitro se construyó la curva de crecimiento (ver figura 9). Para realizar el conteo de las microalgas se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Hematocitómetro.
- Pipeta Pasteur de vidrio.
- Microscopio óptico.
- Cubre objetos.
- Las muestras.
- Tubos de ensayo para las diluciones.

El hematocitómetro o cámara de Neubauer (ver figura 14(a)) es un instrumento para contar células en un medio líquido, está formado de una capa gruesa de vidrio de 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. Las zonas en las que se realiza el conteo son dos retículas cuadrangulares (ver figura 15(a)). Cada retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. En cada una de ellas se encuentran 9 cuadrados de 1 mm de lado (ver figura 14(b)).

Procedimiento de conteo celular:

- Se coloca encima de la parte central del hematocitómetro un cubre objetos.
- Las células de *Porphyridium cruentum* se sedimentan rápidamente debido a su tamaño.

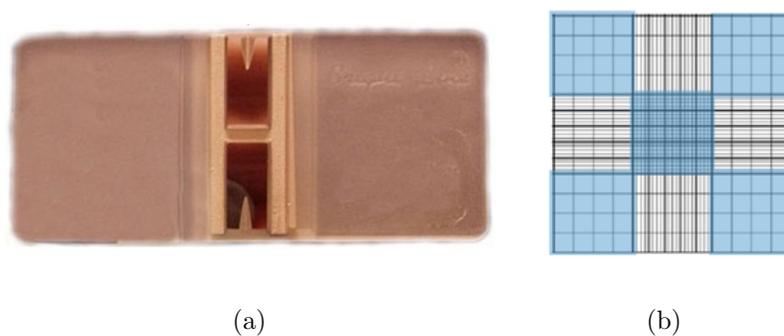


Figura 14. Instrumentos utilizados para contar células. (a) Hematocitómetro o cámara de Neubauer. (b) Retícula de conteo

- Para llenar la pipeta Pasteur de forma adecuada, se agita la muestra para homogeneizarla.
- La forma adecuada en que se debe cargar con la muestra el hematocitómetro, es colocar la punta de la pipeta en la muesca del hematocitómetro (ver figura 15(a)), a aproximadamente 45° respecto a una superficie plana en la que se encuentre colocado el hematocitómetro (ver figura 15(b)).
- Se oprime el embolo de la pipeta para cargar el hematocitómetro.

Se realiza el mismo procedimiento para la segunda zona de conteo.

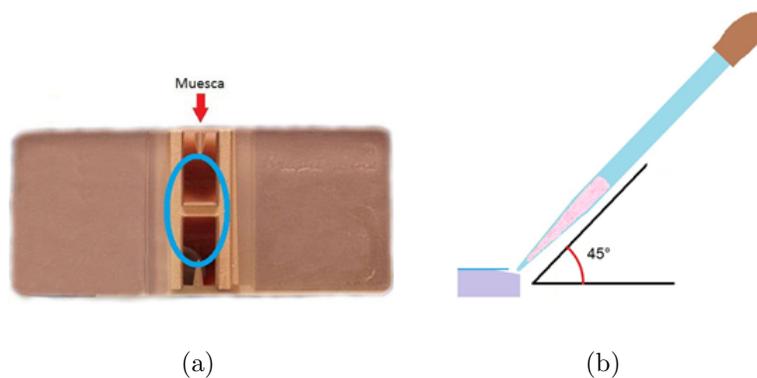


Figura 15. Forma correcta de utilizar el hematocitómetro. (a) Muesca y zona de conteo en el hematocitómetro. (b) Forma de colocar la pipeta para colocar la muestra.

El hematocitómetro cargado con las microalgas se acomoda en el microscopio óptico para realizar el conteo. Al contar las células se hicieron las siguientes consideraciones (ver figura 16):

- Las células en las condición A y B pueden considerarse células.
- En la posición C a pesar de ser más pequeñas se consideran dos células.
- Particularmente en este trabajo, las células en posición D se considera una célula dentro de la retícula y por lo tanto es contada.
- E se considera fuera de la retícula y no es contada.

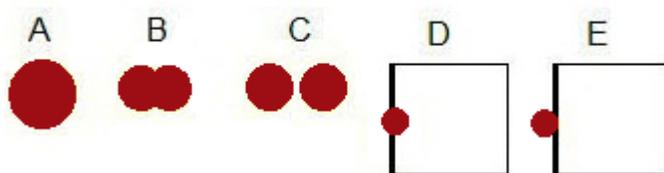


Figura 16. Consideraciones de las posiciones en las que se encuentran las células en las cuadrícula, para el conteo de células utilizando la retícula.

Debido a que la concentración de células es baja, durante el conteo solo se consideraran las zonas C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 y C8, que se muestran en la figura 17.

El número de células x , se obtiene del promedio del conteo resultante de cada cuadrantes, es decir:

$$x = \frac{(C1 + C2 + C3 + C4 + C5 + C6 + C7 + C8)}{8}. \quad (7)$$

El número de células por mililitro (NC) se calcula aplicando la ecuación 8,

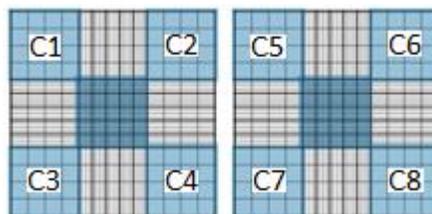


Figura 17. Esquema de las cuadrícula utilizada en el conteo celular (hematocitómetro).

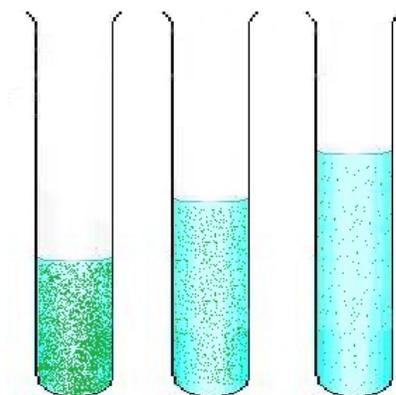


Figura 18. Ejemplos de las diluciones del medio para obtener diferentes concentraciones de células.

$$\frac{NC}{ml} = x \times FD \times 10000, \quad (8)$$

donde FD es el factor de dilución. Si el número promedio de células por cuadrante está por encima de 50 células (ver figura 18) Se aplica una dilución.

Con cada dilución se obtienen diferentes concentraciones de células. El factor de dilución se determina mediante la siguiente ecuación:

$$FD = \frac{V_F}{V_T}, \quad (9)$$

donde V_T es el volumen inicial de muestra , V_F es el volumen final que se obtiene al agregar agua de mar estéril al volumen inicial (V_T).

Con el número de células por mililitro se crea la curva de crecimiento (ver figura 9) de la microalga *Porphyridium cruentum*.

Las características del ambiente en el que se desarrollo el cultivo son:

- Temperatura de $20 \pm 1^\circ C$.
- Iluminación unilateral de $\frac{100\mu E}{m^2 A}$.

La concentración de nutrientes fue agregada al momento de la inoculación y no se agregaron más nutrientes en el resto del proceso de crecimiento. Para extraer las muestras del matraz se empleó una campana de flujo laminar "airclean 600", que genera en su interior un ambiente estéril empleando luz ultravioleta. El aire que circula dentro de la campana no sale de ella y se utilizó un mechero para propiciar una área estéril y eliminar cualquier tipo de contaminación por medio del calor.

3.2.1 Cálculo de tasa de crecimiento y producción de células diarias

Utilizando el conteo celular diario se calcula la tasa de crecimiento específico (μ). Para este cálculo se utilizó la ecuación 10, debido a que el incremento celular es en mayor medida por división binaria. Se empleó la transformación del número de células a \log_2 .

$$\mu = \frac{\log_2(N_2) - \log_2(N_1)}{t_2 - t_1}, \quad (10)$$

donde N_2 el número de células en el tiempo t_2 (en días) y N_1 el número de células en el tiempo t_1 (en días).

Para calcular la producción de células diarias (Pd), se utiliza la ecuación:

$$PD = N_2 - N_1. \quad (11)$$

3.3 Extracción de pigmentos

Durante el periodo de crecimiento, se extrajo $2ml$ diarios del cultivo para realizar análisis de pigmentos. Para la extracción del pigmento se filtró a la microalga del medio en el que está suspendida, utilizando:

- Filtro de fibra de vidrio Whatman $\frac{GF}{F}$ con poro de $1.02\mu m$ (ver figura 19).
- Porta filtros para jeringa (ver figura19).
- Jeringa de $5ml$.
- Pinzas.
- Eppendorf de $2ml$.
- Pipeta automática.

El proceso de filtrado es el siguiente:

- El filtro se coloca dentro del porta filtro.
- Se retira el émbolo de la jeringa y se enrosca al porta filtro.
- La muestra se agita para homogeneizar, tomando $2ml$ con la pipeta automática.
- La jeringa con el porta filtro se posiciona verticalmente y se deposita la muestra dentro de la jeringa.
- El émbolo se pone de nuevo y se oprime. Las microalgas quedan en el filtro mientras el medio en el que están suspendidas pasa a través de él.
- Por último se abre el porta filtros y se retira el filtro tomándolo de la orilla, es doblado a la mitad y guardado en un Eppendorf en un congelador a $20\text{ }^{\circ}C$ hasta su análisis.

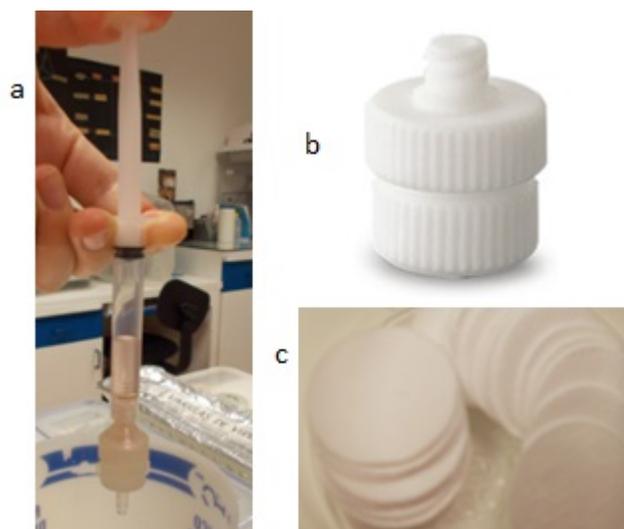


Figura 19. Filtrado de la microalga *Porphyridium cruentum*. (a) Ejemplo de filtrado de las muestras. (b) Porta filtros para jeringa. (c) Filtros de fibra de vidrio.

3.3.1 Determinación de la concentración de clorofila *a* y carotenoides por el método espectroscópico

Los pigmentos de las células filtradas se extraen con acetona al 90%, por cada 2ml de muestra filtrada se utilizaron 0.75ml de acetona. Las muestras con acetona se introducen dentro de una bolsa oscura en un frigorífico a 4 °C. A partir de las 12 horas después de poner la acetona se pueden realizar mediciones. El primer método espectrofotométrico de medición de pigmentos de algas en agua del mar fue desarrollado por Richards y Thompson (1952). Algunas mejoras de este método se sugieren por Parsons (1963). Las ecuaciones espectrofotométricas utilizadas para el cálculo de la concentración de pigmentos se obtuvieron de Jeffrey y Humphrey (1975).

El proceso para la medición de pigmentos utilizando un espectrofotómetro (Hach DR 4000 UV), es el siguiente:

- Es importante sacar las muestras del refrigerador, para que antes de realizar las mediciones estén a temperatura ambiente (aproximadamente una hora).

- Se realiza la medición del espectro de absorbancia de la acetona al 90%, como referencia.
- La medición de espectro de absorbancia de la acetona se resta al espectro de absorbancia de la muestra automáticamente en el espectrofotómetro, para obtener la medición del espectro de absorbancia de los pigmentos extraídos.

Con base en el método utilizado por Richards y Thompson (1952) para la estimación de las concentraciones de clorofila *a* y carotenoides a partir de los espectros de absorbancia de los pigmentos se seleccionan los valores que corresponden a las longitudes de onda $480nm$, $510nm$, $664nm$, $647nm$, $630nm$ y $750nm$. De acuerdo con el método se debe hacer una corrección debido a una pequeña turbidez del blanco para los valores de absorbancia de las longitudes de onda antes mencionadas, mediante la siguiente ecuación:

$$E_{\lambda c} = E_{in\lambda} - (E_{750}), \quad (12)$$

donde $E_{in\lambda}$ representa la absorbancia mediada a $664nm$, $647nm$, $630nm$, $480nm$ y $510nm$, respectivamente entonces $E_{\lambda c}$ será el valor en absorbancia de la longitud de onda corregida y E_{750} representa la absorbancia en $\lambda = 750nm$. Al finalizar la corrección se utilizan las ecuaciones 13 y 14 para obtener las concentraciones de clorofila *a* (C_A) y carotenoides (C_M):

$$C_M = 7.6 * (E_{480} - 1.49 * E_{510}), \quad (13)$$

$$C_A = 11.85 * E_{664} - 1.54 * E_{647} - 0.08 * E_{630}, \quad (14)$$

las concentraciones de clorofila a y carotenoides tienen unidades en $\frac{\mu g}{l}$ o bien $\frac{\mu g}{m^3}$, para una cubeta de 1 cm de ancho. Se debe realizar un ajuste a las ecuaciones para analizar los datos obtenidos con la cubeta de 1 mm de grosor. Como la absorbancia es adimensional y se relaciona con la transmitancia de la forma:

$$A = -\log T = -\log(e^{-\mu_a L}), \quad (15)$$

donde A es la absorbancia, T la transmitancia, μ_a el coeficiente de absorción y L el grosor de la celda. Las unidades $\frac{\mu g}{l}$ de las ecuaciones 13 y 14 provienen de las constantes en las ecuaciones. Por lo tanto para la celda de 1 mm utilizada en este trabajo la concentración de clorofila a y carotenoides esta dada por:

$$C_m = .76 * (E_{4.8} - 1.49 * E_{510}), \quad (16)$$

$$C_a = 1.185 * E_{664} - 1.54 * E_{647} - 0.08 * E_{630}, \quad (17)$$

las unidades de las ecuaciones 16 y 17, estarán en $\frac{\mu g}{ml}$, al igual que las ecuaciones 13 y 14. Una vez realizado el ajuste se emplea la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu g}{l} (\text{clorofila a o carotenoides}) = \frac{C x v}{V x 10}, \quad (18)$$

donde C se sustituye por C_a y C_m respectivamente, V es el volumen de muestra que se filtró en litros, v es el volumen de acetona que se colocó para la extracción de pigmentos en ml .

3.4 Resultados

3.4.1 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó utilizando los conteos de células diarios de las tres muestras. En la figura 20, la línea negra representa el promedio diario contabilizado del día 0 al 10. En la curva de crecimiento se aprecian las fases de adaptación al medio día cero y uno, exponencial del día uno al día tres y la lineal del día tres al día diez. La máxima densidad celular fue la del día diez la cual fue $2.8 \pm 0.21 \times 10^6 \text{ cel/ml}$.

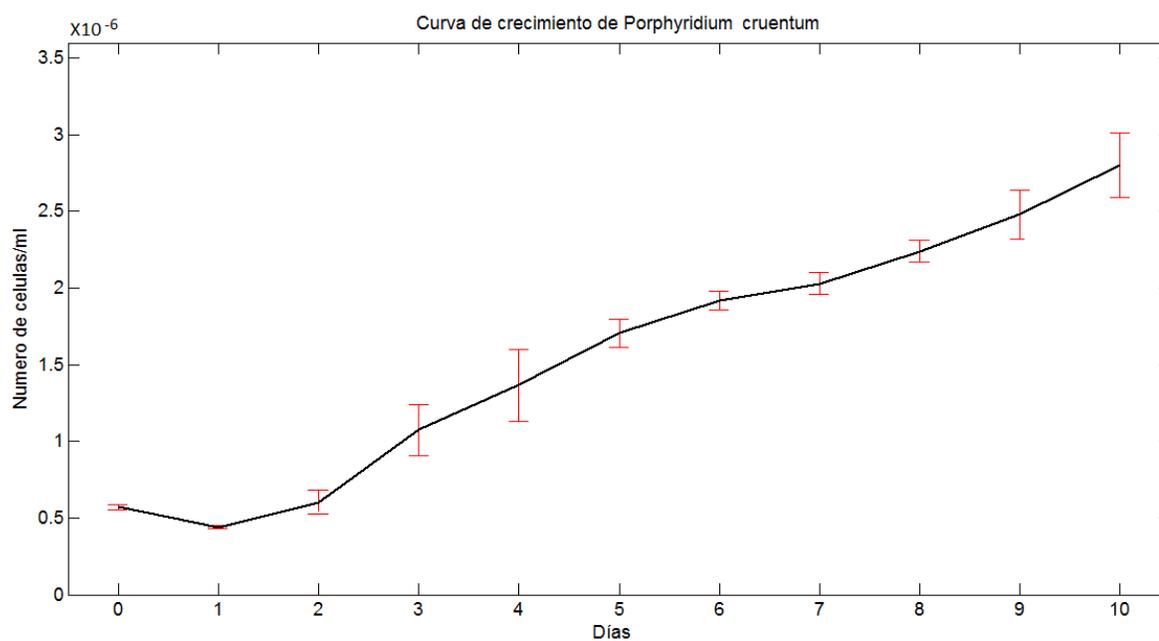


Figura 20. Curva de crecimiento promedio de *Porphyridium cruentum* (día 0-10).

La concentración de clorofila *a* y carotenoides, la densidad de células por mililitro y la velocidad de crecimiento se muestran en la tabla 2. La tasa de crecimiento máxima fue 0.833 ± 0.041 el día cuatro y la producción de células de ese día fue de $1.073 \times 10^6 \text{ cel/ml}$.

La figura 21 muestra el comportamiento de la tasa de crecimiento del *Porphyridium cruentum* del día uno al diez. Se aprecia como la tasa de crecimiento decae a partir del

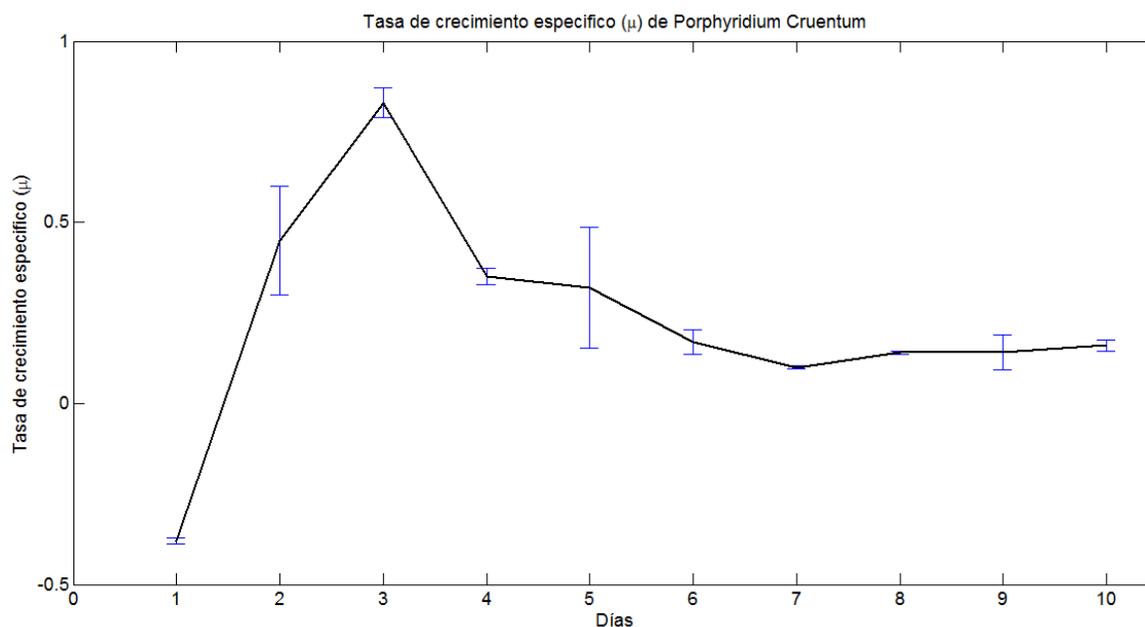


Figura 21. Tasa de crecimiento específico (μ) de la microalga *Porphyridium cruentum* (día 1-10).

cuarto día hasta el día diez .

3.4.2 Concentración de pigmentos

La extracción de pigmentos fue un proceso diario, durante el periodo de crecimiento del *Porphyridium cruentum* (día 0-10). Para realizar el cálculo de la concentración de pigmentos se requirió del espectro de absorbancia de los pigmentos extraídos utilizando acetona. La figura 22 muestra los espectros de absorbancia de los pigmentos extraídos de los días tres y ocho, se aprecia claramente un aumento en la absorbancia del día tres respecto al ocho, en ciertos intervalos de longitudes de onda se distinguen picos más pronunciados para cada uno de los días. Esto se debe a las variaciones en la concentración de carotenoides y clorofila *a*.

Tabla 2. Valores promedio de la concentración de pigmentos, cantidad de biomasa (células/ml $\times 10^6$) y variables de población para *Porphyridium cruentum*.

tiempo en días	clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/l}$)	carotenoides ($\mu\text{g/l}$)	densidad celular (células/ml)	velocidad de crecimiento (μ)	Producción diaria (células/ml)
0	0.261 ± 0.001	0 ± 0	0.573 ± 0.017		
1	0.302 ± 0.001	0.202 ± 0.009	0.440 ± 0.010	-0.380 ± 0.009	-0.133
2	0.394 ± 0.001	0.143 ± 0.010	0.603 ± 0.077	0.451 ± 0.150	0.163
3	0.600 ± 0.001	0.310 ± 0.011	1.073 ± 0.167	0.833 ± 0.041	0.470
4	0.573 ± 0.008	0.278 ± 0.011	1.370 ± 0.933	0.354 ± 0.022	0.297
6	1.110 ± 0.010	0.144 ± 0.030	1.920 ± 0.060	0.182 ± 0.034	0.255
7	0.988 ± 0.036	0.371 ± 0.023	2.030 ± 0.070	0.101 ± 0.005	0.111
8	0.939 ± 0.023	0.341 ± 0.016	2.240 ± 0.070	0.143 ± 0.005	0.210
9	1.750 ± 0.014	0.114 ± 0.015	2.480 ± 0.160	0.142 ± 0.048	0.241
10	1.801 ± 0.013	0.104 ± 0.020	2.801 ± 0.210	0.163 ± 0.015	0.322

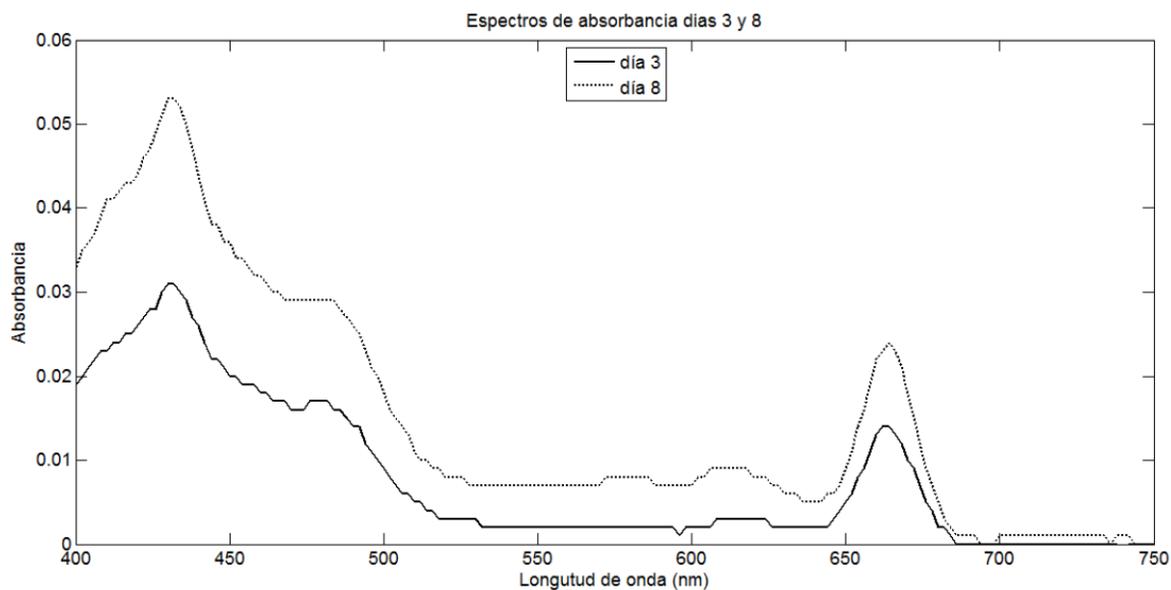


Figura 22. Espectros de absorción de las muestras de *Porphyridium cruentum* para los días 3 y 8.

La figura 23 se presentan a las variaciones de las concentraciones de clorofila *a* y carotenoides diaria del día 0–10, además del error en las mediciones. La máxima

concentración de clorofila *a* se presentó el día diez y fue de $1.801 \pm 0.013 \mu\text{g}/\text{l}$, cuando la irradiancia que llegaba a las microalgas de *Porphyridium cruentum* era baja debido a la alta densidad de células ($2.801 \pm 0.210 \times 10^6 \text{ cel}/\text{ml}$). En el caso de los carotenoides la máxima concentración ocurrió el día siete con $0.371 \pm 0.023 \mu\text{g}/\text{l}$ y una concentración de células de $2.070 \pm 0.070 \times 10^6 \text{ cel}/\text{ml}$ (ver tabla 2). En la figura 23 es posible apreciar un aumento de la concentración de carotenoides del día cero hasta el día siete, debido a las bajas concentraciones de células la irradiancia que llega a las células de *Porphyridium cruentum* es grande. La cantidad de clorofila *a* aumenta conforme hay efectos de auto sombreado en los cultivos por efecto de aumento en la densidad de células.

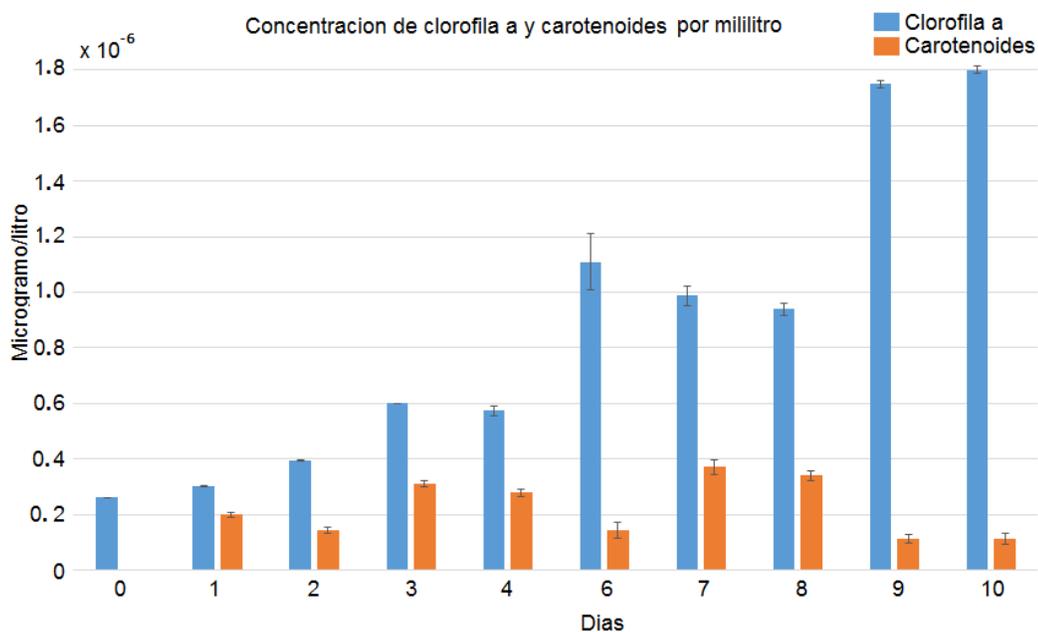


Figura 23. Concentración de pigmentos de la microalga *Porphyridium cruentum* días 0 – 10. Concentración de clorofila *a* (barras color azul). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).

En la figura 24 se muestran la concentración de carotenoides y clorofila *a* por célula diaria. Se aprecia que la concentración de carotenoides inicial fue cero, para el día uno debido a la alta irradiancia que perciben las células hay un aumento de cero

del día cero hasta $4.5 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$. Los días dos, tres y cuatro la concentración de carotenoides permaneció casi constante alrededor de $2.2 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$. El día seis se aprecia un decremento de $2.05 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ del día cuatro hasta $0.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ del día seis. El día siete se aprecia un aumento de más del doble de concentración respecto al día seis. A partir del día siete hasta el día diez la concentración de carotenoides bajo esto debido a la baja irradiancia que perciben las células de *Porphyridium cruentum*.

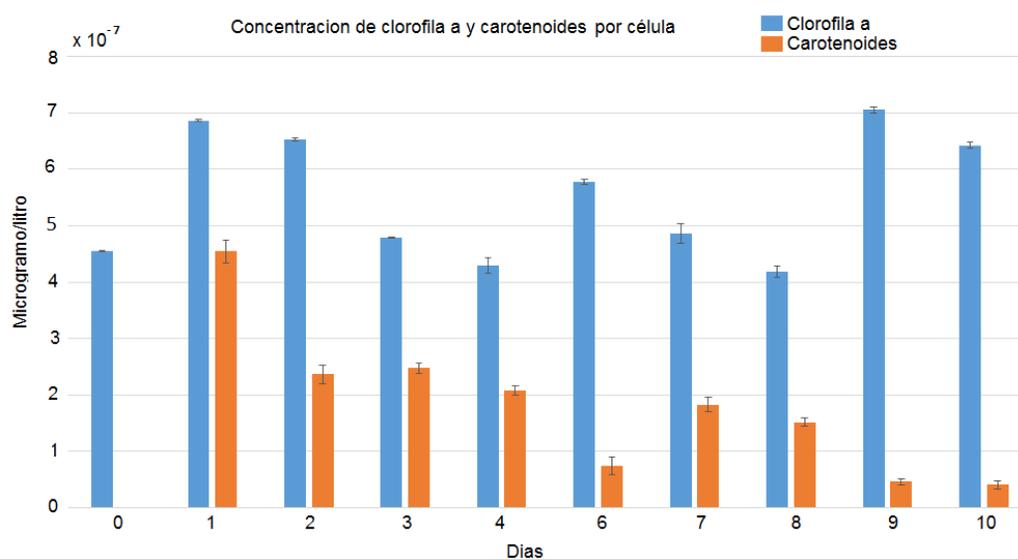


Figura 24. Concentración de pigmentos por célula de la microalga *Porphyridium cruentum* días 0 – 10. Concentración de clorofila *a* (barras color azul). Concentración de carotenoides (barras color anaranjado).

La concentración de clorofila *a* por célula del día cero fue $6.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$, para el día uno hubo un aumento de $2.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ respecto a la concentración del día cero. A partir del día uno la concentración de clorofila disminuyó de $6.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ hasta $4.2 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ el día cuatro. El día seis hubo un incremento de $4.2 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ el día cuatro a $5.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ del día seis. A partir del día seis y hasta el día ocho hay un decremento de $1.6 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$. Los días nueve y diez aumento la concentración a $7.05 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ el día siete y $6.4 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ el día diez.

Capítulo 4

Caracterización óptica de *Porphyridium cruentum*

En este capítulo se encuentra la metodología y los arreglos experimentales empleados para obtener las secciones transversales de absorción, esparcimiento y extinción, así como el factor de anisotropía de la microalga *Porphyridium cruentum* durante las fases exponencial, lineal y de adaptación. Se incluye también una sección de análisis de esparcimiento sencillo y múltiple por medio de diluciones de una muestra de cultivo de *Porphyridium cruentum*.

4.1 Secciones transversales de absorción, extinción y esparcimiento

La solución de Beer-Lambert, considera la interacción de la luz al pasar a través de un medio, y como esta es absorbida y presenta esparcimiento sencillo (figura 25) debido a las características del material (en transmisión). Además relaciona la intensidad de la luz antes de pasar por el medio (de entrada) y después de haber pasado a través medio (de salida). La ecuación de Beer-Lambert se puede escribir como (Lambert, 1892):

$$\frac{I_{out}}{I_{in}} = 10^{-\mu_e l}, \quad (19)$$

donde I_{out} es la intensidad de salida, I_{in} la intensidad de entrada, μ_e es el coeficiente de extinción y l es el ancho del medio que atraviesa la luz.

Mediante la derivación de la solución de Beer-Lambert es posible calcular la sección trasversal de extinción. Cuando la luz pasa a través de un medio con partículas es reducida proporcionalmente a la cantidad de luz absorbida o esparcida

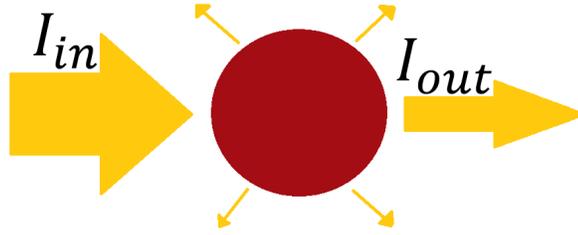


Figura 25. Esquema de propagación de luz al pasar por un medio con una partícula.

por las partículas (considerando que el medio en el que están suspendidas no presenta absorción o esparcimiento). Este cambio en la irradiancia para una rebanada infinitesimal del medio se expresa mediante la ecuación:

$$\frac{dI}{I_z} = -C_e \rho dz, \quad (20)$$

donde C_e representa el área efectiva vista la luz (sección transversal de extinción), I_z es la intensidad de entrada en la rebanada infinitesimal en el eje z , dI es la intensidad absorbida en la rebanada, por último ρ es la densidad volumétrica (número de partículas suspendidas en el medio). Al integrar la ecuación 20 considerando que $z \ 0 \leq z \leq L$ y obtenemos;

$$\ln(I_{out}) - \ln(I_{in}) = -C_e \rho L, \quad (21)$$

y también puede expresarse como

$$\ln \frac{I_{out}}{I_{in}} = -C_e \rho L, \quad (22)$$

donde la ecuación I_{out} es la intensidad de salida, I_{in} es la intensidad de entrada, L es el espesor del medio. Despejando la sección transversal de extinción de la ecuación 22 tenemos que:

$$C_e = \frac{1}{\rho L} \ln \frac{I_{out}}{I_{in}}. \quad (23)$$

La ecuación 23 se puede expresar en términos de potencia como la ecuación:

$$C_e = \frac{1}{\rho L} \ln \frac{P_{outE}}{P_{in}}, \quad (24)$$

donde P_{outE} representa la potencia después de pasar por la muestra y P_{in} la potencia de entrada. Para medir la sección transversal de absorción se reúne toda la luz que es esparcida por las microalgas, se considera que las pérdidas por esparcimiento son cero. Además como se mencionó con anterioridad C_e es igual a las sumas de C_a y C_s , de manera que la ecuación se simplifica y queda en función de la sección transversal de absorción, por lo que puede escribirse como:

$$C_a = \frac{1}{\rho L} \ln \frac{P_{outA}}{P_{in}}. \quad (25)$$

El cálculo de la sección transversal de esparcimiento se realiza restando las ecuaciones 24 y 25, esto es:

$$C_s = C_e - C_a. \quad (26)$$

4.1.1 Arreglos experimentales para la medición de secciones transversales de absorción y esparcimiento

En esta parte de la tesis se describe los arreglos ópticos empleados para las mediciones de secciones transversales de absorción y extinción. Los dos arreglos experimentales tienen muchos elementos en común sin embargo, la ubicación del foco de la lente y la forma en que se colectó la luz es distinta.

El arreglo empleado para la medición de la sección transversal de absorción es mostrado en la figura 26. El arreglo incluye una fuente de luz blanca (a); para limitar

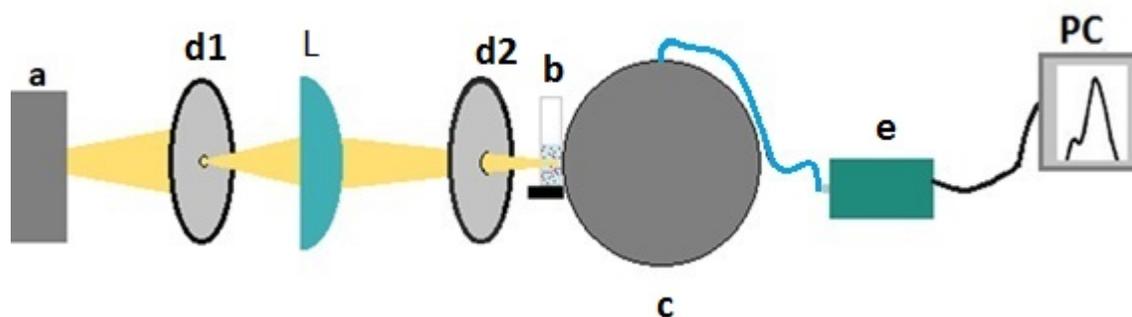


Figura 26. Esquema del arreglo experimental para la medición de la sección transversal de absorción; incluye una fuente de iluminación (a), dos diafragmas ($d1$ y $d2$), una lente (L), una esfera integradora (c), un espectrómetro (e) y una computadora.

el ancho del haz de la fuente óptica se utiliza un diafragma ($d1$) y mediante esta reducción, es posible que el ancho del haz pase a través de una lente (L) con distancia focal de 7cm ; el haz enfocado se hace incidir sobre la muestra (b). Entre la lente y la muestra se coloca otro diafragma ($d2$), que tiene la función de impedir que la luz no proveniente de la lente pase hacia la muestra y provoque errores en la medición, por último se encuentra el detector. Este arreglo experimental como se mencionó anteriormente, requiere recolectar la mayor parte de la luz esparcida por las microalgas de *Porphyridium cruentum*, en este caso se emplea una esfera integradora (c), la muestra es colocada lo más cerca posible a la entrada de la abertura de medición de la esfera integradora. La esfera funciona colectando la luz esparcida hacia delante por las microalgas. La esfera integradora está conectada a un espectrofotómetro Ocean Optics usb4000 (e) y este es conectado a una computadora para capturar el espectro de la muestra.

El esquema para la medición de la sección transversal de extinción se muestra en la figura 27. Como fuente óptica se emplea una fuente de luz blanca (a) Ocean Optics HL-2000; seguida de un diafragma ($d1$) que permite ajustar el ancho del haz a un tamaño

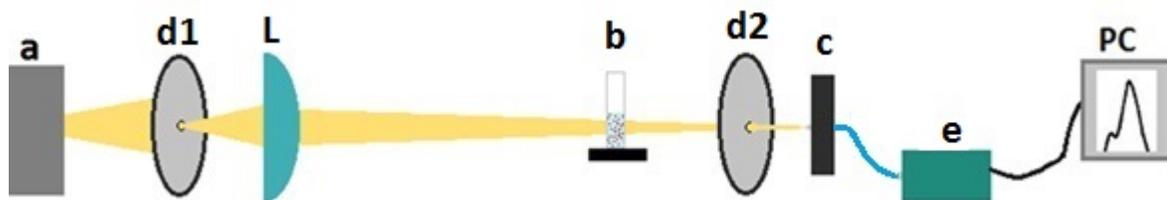


Figura 27. Esquema del arreglo experimental para la medición de la sección transversal de extinción; incluye una fuente de iluminación (a), dos diafragmas ($d1$ y $d2$), una montura para la fibra óptica (c), un espectrómetro (e) y una computadora.

adecuado para pasar a través de la lente (L), cuya distancia focal es de 50 cm. El haz enfocado se hace incidir directamente en la entrada a fibra óptica que está en la montura (c). Igual que el arreglo experimental antes mencionado, se emplea el espectrofotómetro Ocean Optics usb4000 como detector. La muestra (b) es colocada entre la lente y el detector, la muestra debe estar lo suficientemente separada del detector para que la luz esparcida por las microalgas no llegue al detector. Para asegurar que la poca luz esparcida que pudiese llegar al detector no entre, se utilizó un diafragma ($d2$) entre la muestra y la montura para la fibra. Los datos son enviados al espectrómetro (e) a través de una fibra óptica y por último estos datos se envían a una Pc.

Para calcular la sección transversal de absorción, se debe medir el espectro de entrada, el espectro después de pasar por la muestra y la corriente de oscuridad. Las mediciones se realizaron de la siguiente forma:

- Se mide el espectro de la fuente, para ello se coloca en la celda de medición agua de mar previamente esterilizada (medio en el que se encuentran suspendidas las microalgas de *Porphyridium cruentum*). Al espectro de este medio sin microalgas lo llamaremos $E_{(\lambda_f)}$.
- Se mide el espectro de absorción o extinción con las microalgas, este espectro se llamara $E_{(\lambda_m)}$.

- Se mide el espectro de la corriente de oscuridad, $(E_{(\lambda_d)})$.

Sustituimos estos datos en la ecuación 25, para calcular la sección transversal de absorción con el cambio de variables se forma la siguiente ecuación:

$$C_a = \frac{1}{\rho L} \ln \frac{E_{(\lambda_m)} - E_{(\lambda_d)}}{E_{(\lambda_f)} - E_{(\lambda_d)}}. \quad (27)$$

La sección transversal de extinción se calcula utilizando la ecuación 24. De igual forma se realiza cambio de variables y se obtiene:

$$C_e = \frac{1}{\rho L} \ln \frac{E_{(\lambda_m)} - E_{(\lambda_d)}}{E_{(\lambda_f)} - E_{(\lambda_d)}}. \quad (28)$$

Después de calcular la sección transversal de extinción y la sección transversal de absorción empleamos la ecuación 26 y se obtiene la sección transversal de esparcimiento.

4.2 Factor de anisotropía de *Porphyridium cruentum*

La función de Henyey y Greenstein describe la dependencia angular de la luz esparcida por partículas pequeñas. La función de esparcimiento de Henyey-Greenstein demostró ser útil en la aproximación de la dependencia del esparcimiento angular de fenómenos de esparcimiento sencillo para tejidos biológicos, se puede escribir como (Henyey y Greenstein, 1941),

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}}, \quad (29)$$

donde θ es el ángulo de desviación y g el factor de anisotropía. De tal manera que

$$\int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin \theta d\theta = 1, \quad (30)$$

y

$$\int_0^\pi p(\theta) \cos \theta 2\pi \sin \theta d\theta = g. \quad (31)$$

El patrón de esparcimiento de $p(\theta)$ se mide utilizando un detector que se mueve formando un círculo alrededor del objeto. Debido a esto, el detector colecta la luz esparcida en varios ángulos, en el plano de incidencia.

En el modelo presentado en esta tesis para la medición de la sección transversal de absorción, se considera que la mayor parte de la luz que es esparcida por las microalgas entra a la esfera integradora y es recolectada, sin embargo, se desconoce la cantidad de luz que es esparcida en el resto de las direcciones. Para estimar el factor de anisotropía es necesario medir la distribución angular de la luz esparcida, como se mencionó en la introducción, es posible simplificar la medición, con base en el modelo desarrollado por Terán (2010).

A continuación se describe el desarrollo utilizado para llegar a la ecuación para el cálculo del parámetro de anisotropía. Si consideramos un medio con muy pocas partículas (muy diluido), podemos suponer que las partículas presentan únicamente esparcimiento sencillo y esparcen de manera independiente. El tamaño de la partícula de entre $8\mu m$ y $16\mu m$ es relativamente grande, así que, para esta aproximación podemos relacionar de manera directa absorción, transmitancia y reflectancia del medio con el parámetro de anisotropía de la partícula. Cuando una onda incidente choca contra un objeto y produce esparcimiento de la luz, la energía de esta es redistribuida en todo el espacio. Para describir la forma en la que el campo es redistribuido se emplea entonces la función de fase descrita por la siguiente ecuación (Terán, 2010):

$$\int_0^{4\pi} P(\theta, \phi) d\Omega. \quad (32)$$

La función de fase representa la probabilidad de que la energía que llega al volumen de la partícula P a través del ángulo sólido $d\Omega$ cuyo eje es paralelo a la dirección ϕ , sea esparcido hacia el ángulo sólido $d\Omega$ con eje paralelo a la dirección θ .

Si el patrón producido por esta distribución de partículas es isotrópico alrededor de ϕ , entonces la ecuación quedaría de la siguiente forma:

$$2\pi \int_0^{2\pi} P(\theta) \sin\theta d\Omega. \quad (33)$$

Haciendo un cambio de variables $x = \cos\theta$, la ecuación se simplifica y queda de la siguiente forma:

$$\int_{-1}^1 p(x) dx = 1, \quad (34)$$

siendo la función $p(x) = 2\pi P(\cos^{-1}x)$. El parámetro de anisotropía se define como el primer momento de la función de fase, entonces:

$$g = \int_{-1}^1 xp(x) dx, \quad (35)$$

como $x = \cos\theta$, g representa el promedio del coseno del ángulo de esparcimiento. La porción de luz esparcida hacia delante, se describe de la siguiente forma:

$$f = \int_0^1 p(x) dx. \quad (36)$$

De igual forma la porción de luz que se esparce hacia atrás se describe mediante:

$$b = \int_{-1}^0 p(x) dx, \quad (37)$$

De acuerdo a la ecuación 34 se debe cumplir $f + b = 1$. A continuación escribimos:

$$g = g_f + g_b, \quad (38)$$

donde

$$g_f = \int_0^1 xp(x) dx, \quad (39)$$

y

$$g_b = \int_{-1}^0 xp(x)dx. \quad (40)$$

En el caso de partículas grandes, el esparcimiento es esencialmente en ángulos pequeños, hacia delante o atrás. Para estos ángulos $x = \cos\theta \simeq \pm 1$, de forma que $g_f \simeq f$ y $g_b \simeq -b$. Mediante esta aproximación tenemos:

$$f - b = g. \quad (41)$$

Partiendo de la condición de la ecuación 41, entonces:

$$f + b = 1. \quad (42)$$

Resolvemos para f y b , la porción de luz esparcida hacia delante se puede escribir:

$$f = \frac{1 + g}{2}. \quad (43)$$

La porción de luz esparcida hacia atrás sería:

$$b = \frac{1 - g}{2}. \quad (44)$$

Si toda la luz es esparcida hacia delante ($g = 1$), $f = 1$ y $b = 0$. En el caso opuesto ($g = -1$), toda la luz esparcida hacia atrás, $f = 0$ y $b = 1$.

Para partículas pequeñas el esparcimiento es isotrópico, esto conlleva $p(x) = p(-x)$ y $f = g = \frac{1}{2}$. Este resultado es consistente con la aproximación 43 y 44.

La validez de estas expresiones para valores intermedios de g depende de la función de fase. Se realizó un análisis y comparación, de la aproximación y la función de fase de Henyey-Greenstein. La figura 28 muestra los valores calculados con base en la función de fase de Henyey-Greenstein, y con base en la aproximación para las expresiones 43 y 44, para las variables f y b . El comportamiento de las funciones muestra coincidencias

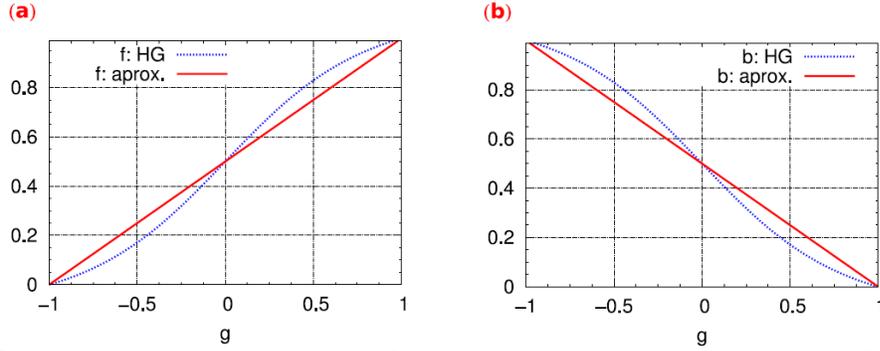


Figura 28. Comparación entre los valores de f y b con la aproximación $x \pm 1$ y con la función de fase de Henyey Greenstein (Ilustración tomada de Benavente-Valdés *et al.*, 2012, p. 89).

en los límites $g = -1$, $g = 1$ y en el centro $g = 0$. Además se aprecia una ligera desviación para los otros valores de g . Esto brinda confianza en las aproximaciones 43 y 44 para f y b . Mediante estas aproximaciones se puede calcular el factor de anisotropía con base en las propiedades de reflectancia y transmitancia del medio (sin necesidad de mediciones de esparcimiento angular).

Por conservación de la energía:

$$A + R + T = 1, \quad (45)$$

siendo T la transmitancia, R la reflectancia y A la absorbancia. Esta expresión se puede escribir también como:

$$\frac{T}{1 - A} + \frac{R}{1 - A} = 1. \quad (46)$$

De esta forma es posible comparar la expresión 46 con la condición 42 y obtener

$$f = \frac{T}{1 - A}, \quad (47)$$

$$b = \frac{R}{1 - A}. \quad (48)$$

Utilizando las ecuaciones 47, 48 y 41, es posible encontrar directamente g en términos de reflectancia y transmitancia, como lo muestra la ecuación 49

$$g = \frac{T - R}{T + R}, \quad (49)$$

esta ecuación es exclusivamente para medios con esparcimiento sencillo.

4.2.1 Descripción del arreglo experimental

La medición del parámetro de anisotropía se realizó utilizando el arreglo propuesto en la tesis de Terán (2010). El arreglo se muestra en la figura 29, el cual consta de:

- Dos espejos móviles (1 y 4).
- Una lente.
- Cinco espejos fijos (2, 3, 5, 6 y 7).
- Láser Helio Neón 12mW, ($\lambda = 632.8nm$).
- Esfera integradora Ocean Optics (Modelo ISP-50-8-R-GT).
- Fotodetector Newport (Modelo 2051-FS-M).

Este arreglo consta de tres haces incidentes, uno se hace incidir sobre la pared y los otros dos sobre la muestra. El espejo 1 es móvil permitiendo medir en reflectancia y transmitancia al pasar por la muestra. La figura 29 muestra los tres haces, el tercer haz mide la componente en transmitancia (T_{cd}), el espejo uno se deja fijo y toda la luz viaja por el lado derecho del arreglo, el haz incide sobre la parte exterior de la muestra. El segundo haz mide la componente en reflectancia, en este caso el espejo uno se remueve y el haz de luz viaja por el lado izquierdo del arreglo e incide sobre la muestra, generando una componente reflectante (R_{cd}). El primer haz viaja por el lado izquierdo del arreglo, bajando los espejos uno y cuatro el haz incide sobre la pared de la esfera, generando

una componente en reflectancia (R_d). Las potencias incidentes de cada uno de los haces son P_1 , P_2 y P_3 . A continuación se emplean las ecuaciones 50, 51 y 52, propuestas por Terán (2010) para el cálculo de la transmitancia y reflectancia.

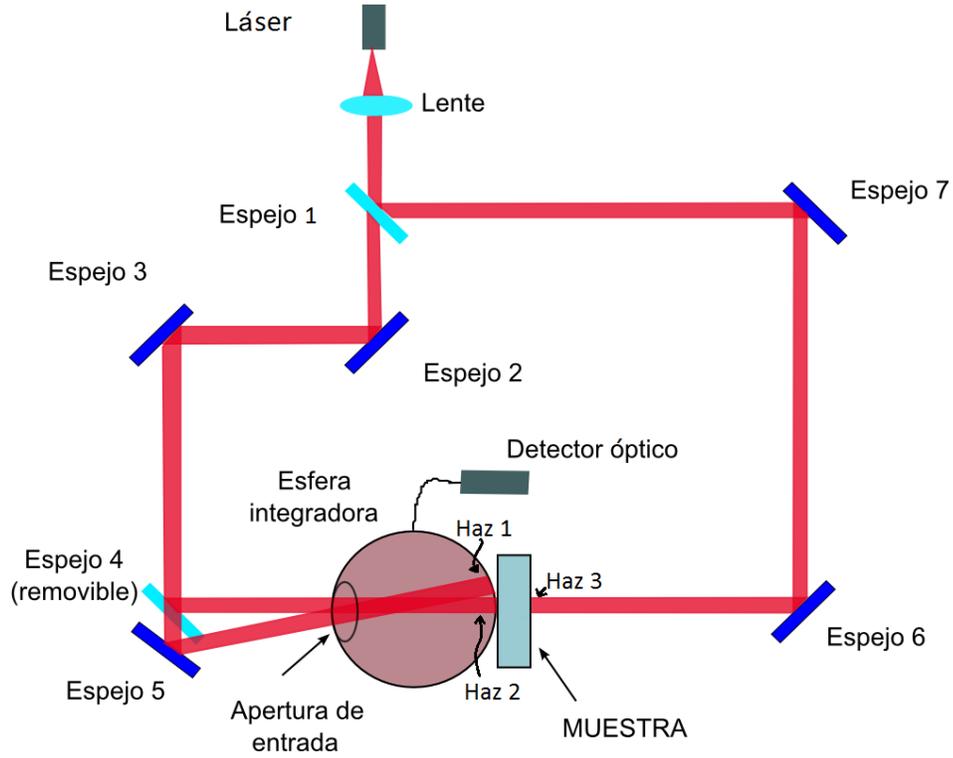


Figura 29. Diagrama del arreglo experimental para la medición del factor de anisotropía, que incluye; un láser Helio Neón $\lambda = 632.8nm$, una lente, dos espejos móviles, cinco espejos fijos, una esfera integradora y un espectrómetro.

$$P_{d1} = \frac{A_\delta}{A} \frac{T_{cd}P_1}{1 - (m\alpha + R_d \frac{A_s}{A} + r \frac{A_\delta}{A})}, \quad (50)$$

$$P_{d2} = \frac{A_\delta}{A} \frac{P_2}{1 - (m\alpha + R_d \frac{A_s}{A} + r \frac{A_\delta}{A})}, \quad (51)$$

$$P_{d3} = \frac{A_\delta}{A} \frac{R_{cd}P_3}{1 - (m\alpha + R_d \frac{A_s}{A} + r \frac{A_\delta}{A})}, \quad (52)$$

donde P_{d1} , P_{d2} y P_{d3} son las potencias detectadas por el foto detector para los haces uno, dos y tres respectivamente. A_δ es el área del detector, A el área de la esfera, m la reflectividad de la esfera ($m=0.98$), α es el área de la esfera sin aberturas y A_s el área

de la muestra. De estas ecuaciones se puede obtener la reflectancia y la transmitancia, de la siguiente forma:

$$T_{cd} = \frac{mP_{d3}P_2}{P_{d2}P_3}. \quad (53)$$

$$R_{cd} = \frac{mP_{d1}P_2}{P_{d2}P_1}. \quad (54)$$

4.3 Análisis de esparcimiento simple y múltiple

Las muestras de *Porphyridium cruentum* fueron analizadas para tener dos parámetros importantes, la mínima cantidad de células por mililitro suficientes para obtener efectos de esparcimiento y absorción detectables por el sistema, y la máxima concentración de células por mililitro posibles en la medición sin tener efectos de esparcimiento múltiple. Las ecuaciones empleadas para obtener las secciones transversales de absorción, esparcimiento y factor de anisotropía, son estrictamente para esparcimiento sencillo. El análisis se inició empleando una muestra de *Porphyridium cruentum* en la fase estacionaria con $4.55 \times 10^6 \text{ cel/ml}$, posteriormente se realizaron las diluciones que muestra la tabla 3.

La figura 30 muestra el $\ln(\frac{P_a}{P_o})$ y el (b) $\ln(\frac{P_e}{P_o})$ en función del número de células. Donde P_a es la potencia absorbida, P_o es la potencia de entrada y P_e es la potencia de extinción para $\lambda = 632.8 \text{ nm}$. Se realizaron ocho diluciones con la intención de localizar los puntos sobre el eje vertical que tienden a ser lineales. La linealidad asegura que el esparcimiento presente en la muestra sea independiente, para asegurar que el esparcimiento sea sencillo se debe cumplir $C_a \rho L \ll 1$ o bien $\ln(\frac{P_a}{P_o}) \ll 1$ esta condición permite obtener una estimación del área que ocupan las microalgas en la región de iluminación. El número máximo de células que cumple con la condición antes mencionada y tiene comportamiento lineal se observa en la figura 30 y es

Tabla 3. Dilución y número de células

Diluyente (agua de mar esterilizada en <i>ml</i>)	Muestra final (<i>ml</i>)	Número de <i>cel/ml(x10⁶)</i>
0	1	4.55
1	2	2.275
2	3	1.517
3	4	1.138
4	5	0.910
5	6	0.758
6	7	0.650
7	8	0.569

aproximadamente $2.275 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ y el mínimo es $0.568 \times 10^6 \text{ cel/ml}$. Para las concentraciones de células que se encuentran en este rango no es necesario realizar diluciones para asegurar que solo exista esparcimiento sencillo. Para valores por encima de $2.275 \times 10^6 \text{ cel/ml}$, se requiere realizar dilución para asegurar la veracidad de los resultados. Realizar las mediciones cuando el número de células se encuentra en el rango de $2.275 \times 10^6 \text{ cel/ml} - 0.568 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ asegura que el esparcimiento sea sencillo para la medición de las secciones transversales y así como el factor de anisotropía.

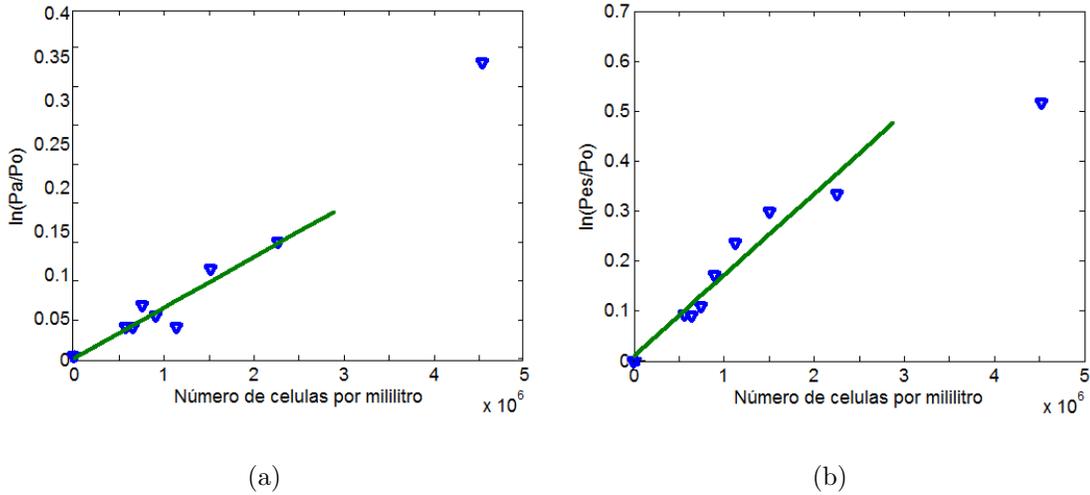


Figura 30. Las diluciones en las mediciones de secciones transversales de absorción y esparcimiento. (a) Es el $\ln(\frac{P_a}{P_o})$ respecto al número de células. (b) Muestra el $\ln(\frac{P_e}{P_o})$ respecto al número de células.

4.4 Cálculo de la incertidumbre en la medición del factor de anisotropía

Para calcular la incertidumbre en la medición de la transmitancia y reflectancia de la muestra, el cálculo de factor de anisotropía, por análisis estadístico. La incertidumbre de una variable x_i se calcula utilizando siguiente ecuación (Taylor, 1997):

$$\Delta x = \frac{S_x}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}, \quad (55)$$

donde

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i \quad (56)$$

donde N es el número de mediciones x_i de una magnitud, \bar{x} representa un promedio de la magnitud sobre la muestra de datos y S_x es la desviación estándar.

Una vez calculado el error para la transmitancia y reflectancia de la muestra, se calculó la propagación del error para la ecuación 49, el error en g debido al error en T es:

$$\Delta g_T = \frac{\partial g}{\partial T} \Delta T, \quad (57)$$

donde Δg_T es el error debido al error en T y ΔT es el error en T . De forma similar el error en g debido al error en R es:

$$\Delta g_R = \frac{\partial g}{\partial R} \Delta R. \quad (58)$$

El desarrollo de la derivada parcial para la propagación del error en T es:

$$\Delta g_T = \frac{2R\Delta x}{(T + R)^2}. \quad (59)$$

Para la propagación del error en R es

$$\Delta g_R = \frac{-2T\Delta R}{(T + R)^2}. \quad (60)$$

Entonces la propagación del error en g queda de la siguiente forma:

$$\Delta g = \frac{2}{(T + R)^2} \sqrt{R^2(\Delta T)^2 + T^2(\Delta R)^2}. \quad (61)$$

4.5 Resultados

Las mediciones de secciones transversales de absorción, esparcimiento y extinción, así como la medición del factor de anisotropía y concentración de pigmentos, mostradas a continuación se realizaron diariamente, durante las fases de crecimiento de la microalga *Porphyridium cruentum* (adaptación, exponencial y lineal). Del día cero al día seis no fue necesario realizar diluciones y que los cálculos realizados en la sección anterior, mostraron de antemano el número máximo de células para el cual aún había presencia únicamente de esparcimiento sencillo. A partir del día siete se realizaron diluciones al

cincuenta por ciento, es decir por un mililitro de muestra de microalgas se agregó un mililitro más de agua de mar esterilizada.

4.5.1 Secciones transversales de extinción, absorción y esparcimiento

En la medición de las secciones transversales de extinción, absorción y esparcimiento se utilizaron los arreglos que se muestran en las figuras 26 y 27. Los datos presentados se obtuvieron mediante el promedio de las nueve mediciones diarias para cada una de las tres muestras, además de dos conteos celulares diarios para todas las muestras. La obtención de los parámetros de secciones transversales se realizó con células vivas de la microalga *Porphyridium cruentum*, con condiciones ambientales de iluminación y temperatura constantes durante todo el periodo de crecimiento. La figura 31 muestra la

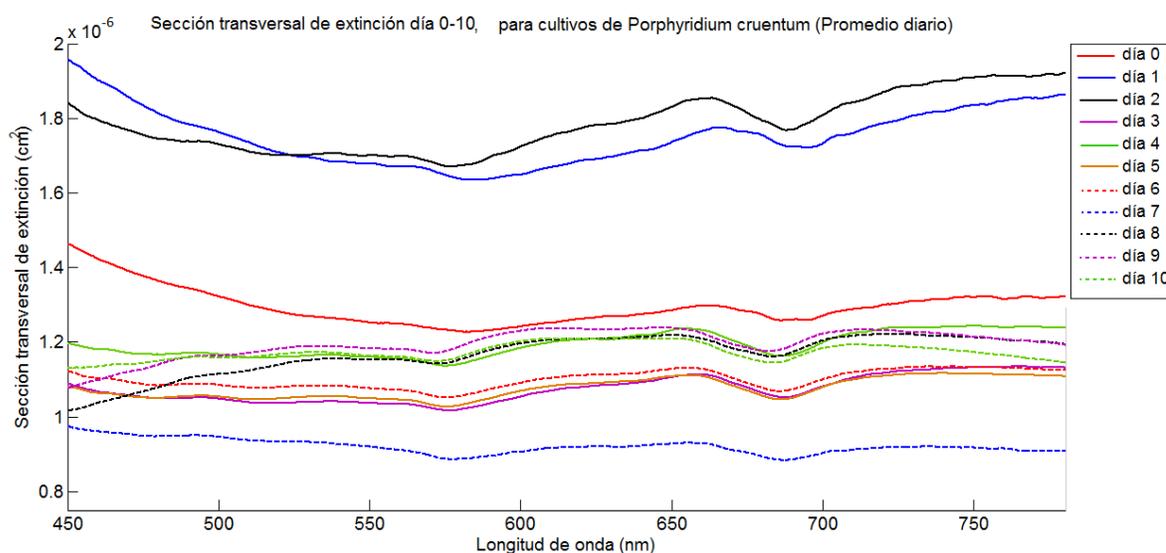


Figura 31. Sección transversal de extinción días 0-10 para cultivos de *Porphyridium cruentum*.

sección transversal de extinción del día cero al diez, en el intervalo visible de 450nm al 780nm , obtenidas con el arreglo experimental que muestra la figura 27. De la figura 31 se puede apreciar variaciones significativas durante las primeras etapas de crecimiento

(del día cero al siete), a partir del día ocho las variaciones son menos significativas. En el periodo correspondiente a los días ocho, nueve y diez, es posible apreciar como la sección transversal de extinción se aproximan a la la sección transversal de extinción del día cero.

El comportamiento de la sección transversal de absorción se logró medir mediante la implementación del arreglo que se muestra en la figura 26. Las mediciones se realizaron en el intervalo de 450nm a 780nm . En la figura 32 se aprecian las variaciones de la sección transversal de absorción, durante las primeras fases de crecimiento de la microalga *Porphyridium cruentum*, el periodo parte del día cero y llega hasta el día diez. Las variaciones de la sección transversal de absorción que se muestran en la figura 32, fueron relativamente pequeñas, se aprecian con mayor claridad del día cero al día cinco.

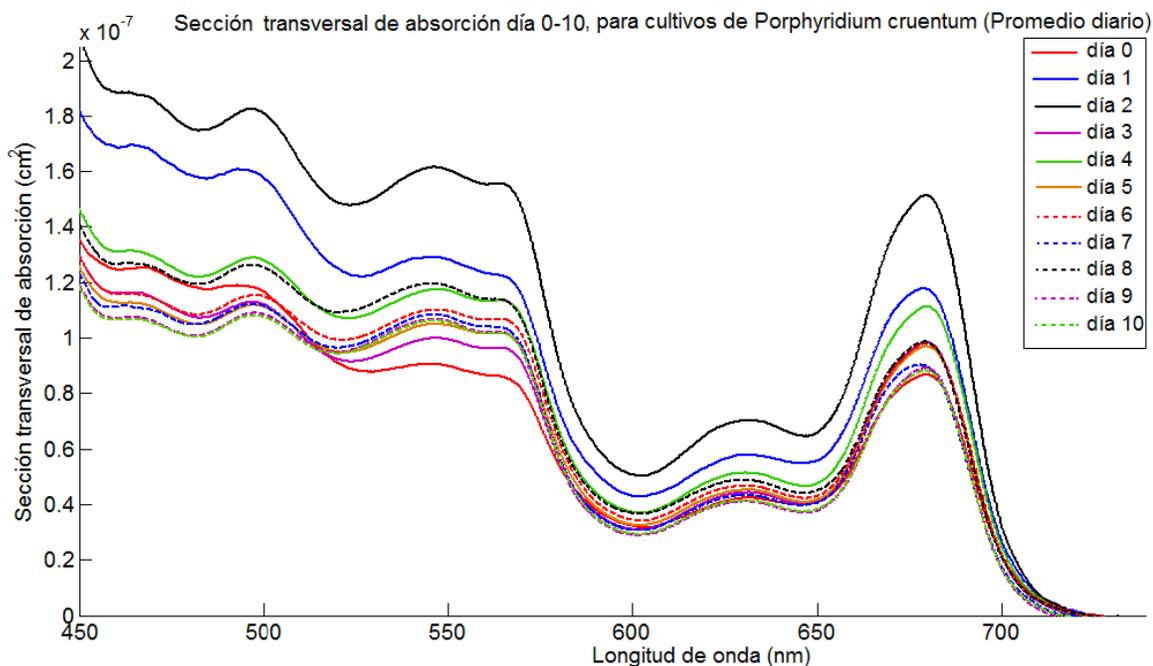


Figura 32. Sección transversal de absorción días 0-10 para cultivo de *Porphyridium cruentum*

A partir del día seis hasta el día diez las variaciones fueron prácticamente insignificantes, sin embargo, durante este periodo es posible apreciar un comportamiento similar al de los días ocho, nueve y diez de la sección transversal de extinción. Las secciones transversales de absorción se aproximan a la sección transversal de absorción del día cero. Podemos mencionar que las secciones transversales de absorción son un orden menor a las secciones transversales de extinción y esparcimiento.

En la figura 33 la línea negra muestra las variaciones de la máxima sección transversal de absorción diaria en el intervalo de $650nm$ a $700nm$, el cual corresponde a uno de los picos de absorción de la clorofila *a*. Del día cero al día tres las variaciones de la sección transversal son considerablemente grandes. Para el resto de los días la variación en la sección transversal de absorción es ligera. En la línea azul se aprecia en comparación las variaciones para $720nm$.

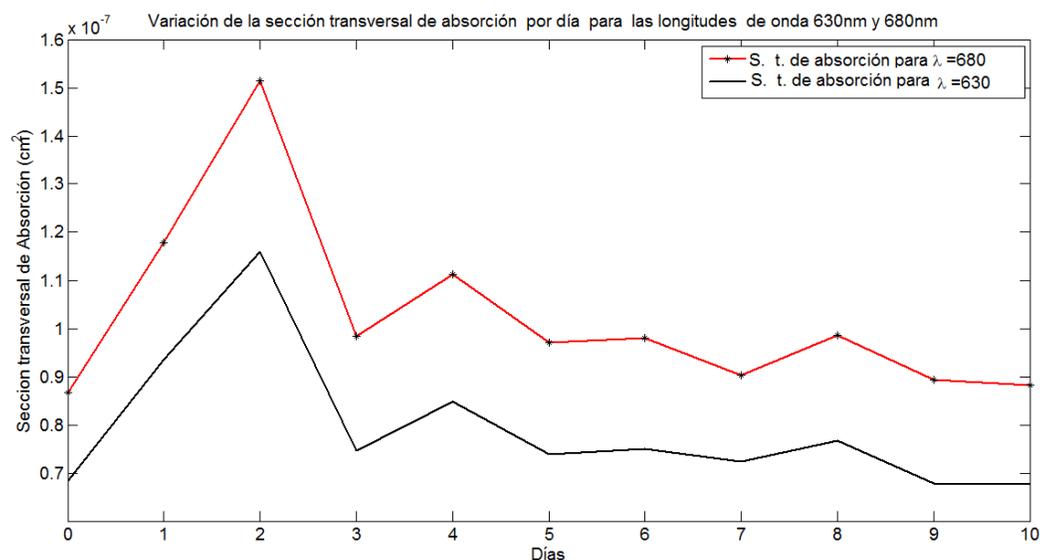


Figura 33. Variaciones de sección transversal de absorción en el rango de $650nm$ a $700nm$ y para $\lambda = 720nm$, del día 0 al día 10 para cultivos de *Porphyridium cruentum*.

En figura 34 se presenta la absorción normalizada por la integral de las secciones

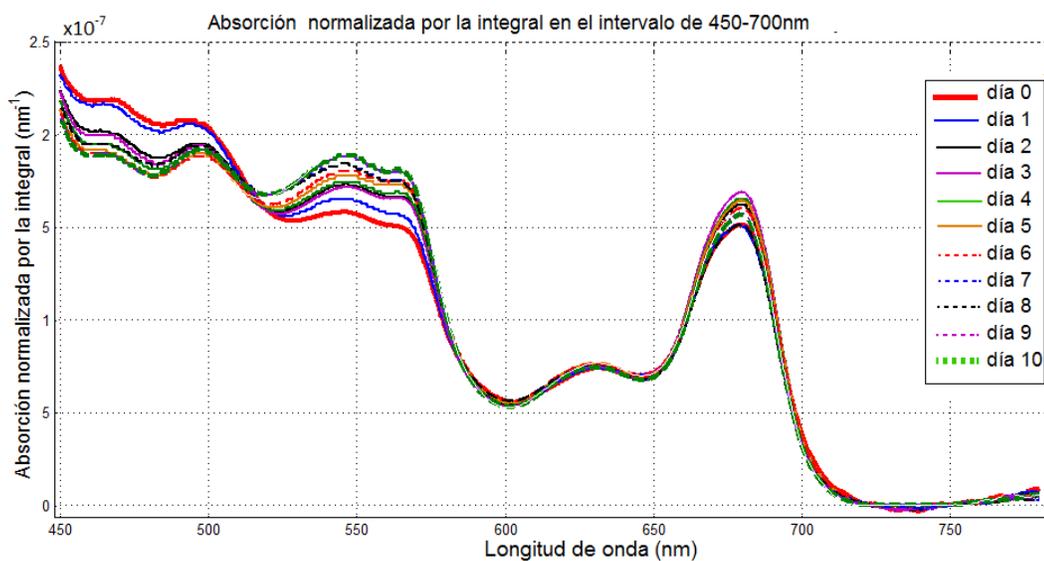


Figura 34. Absorción normalizada por la integral en el intervalo de 450 – 700nm, de los días 0 – 10 para cultivo de *Porphyridium cruentum*.

transversales de absorción, en el intervalo de longitudes de onda de la radiación fotosintéticamente activa (definida entre 450 – 700nm). Podemos dividir el espectro de absorción en tres zonas: primera zona aproximadamente 450 – 520nm, que presenta absorción de los pigmentos carotenoides; la segunda en el intervalo de 520 – 600nm, que se caracteriza por la absorción de ficoeritrina, y la última para longitudes de onda mayores a 600nm, que muestra variaciones de absorción de clorofila *a*. En las presentes curvas se aprecia claramente que en los días 0-10 la absorción de los carotenoides disminuye (primera zona) y al mismo tiempo aumenta la absorción de ficoeritrina, mientras que la absorción de la clorofila casi no cambia durante esos días.

El cálculo de las secciones transversales de esparcimiento se realizó utilizando la ecuación 26. Es evidente que debido a la magnitud de las secciones transversales de absorción, un orden menor a las magnitudes de las secciones transversales de extinción, la forma de las secciones transversales de esparcimiento será similar a la de

las secciones transversales de extinción. Relacionando la forma de los picos de las secciones transversales de absorción, en los intervalos $550nm - 600nm$ y $650nm - 700nm$, que corresponden al pico de absorción de ficocianina y a uno de los picos de absorción de la clorofila a , respectivamente. Estos picos coinciden con los valles apreciables en los mismos intervalos $550nm - 600nm$ y $650nm - 700nm$, de las secciones transversales de esparcimiento.

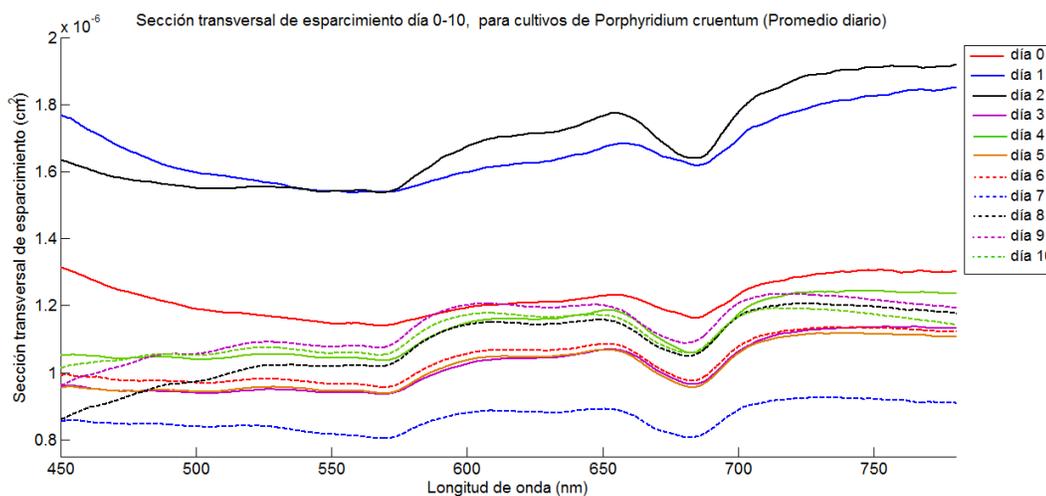


Figura 35. Sección transversal de esparcimiento días 0-10 para un cultivo de *Porphyridium cruentum*.

La figura 36 muestra las variaciones de la sección transversal de esparcimiento diaria, para el uno de los picos de absorción correspondiente a los carotenoides $500nm$ y para $750nm$. Los cambios en la sección transversales para estos picos de absorción son similares en los días 0, 3, 4, 5 y 6. Del día cero, al día uno las variaciones de la sección transversal son considerablemente grandes. Del día uno al dos hay un incremento para $\lambda = 750nm$ y para $\lambda = 500nm$ se presenta un decremento. En el intervalo del día tres al seis no hay diferencia entre la forma que presenta la sección transversal de esparcimiento para $500nm$ y $750nm$. Del día seis al día diez hay variaciones mínimas para ambas longitudes de onda sin embargo, la forma no es la misma. La línea azul en la figura 36 representa la variación para $\lambda = 750nm$ y la línea negra representa las

variaciones para $\lambda = 500nm$.

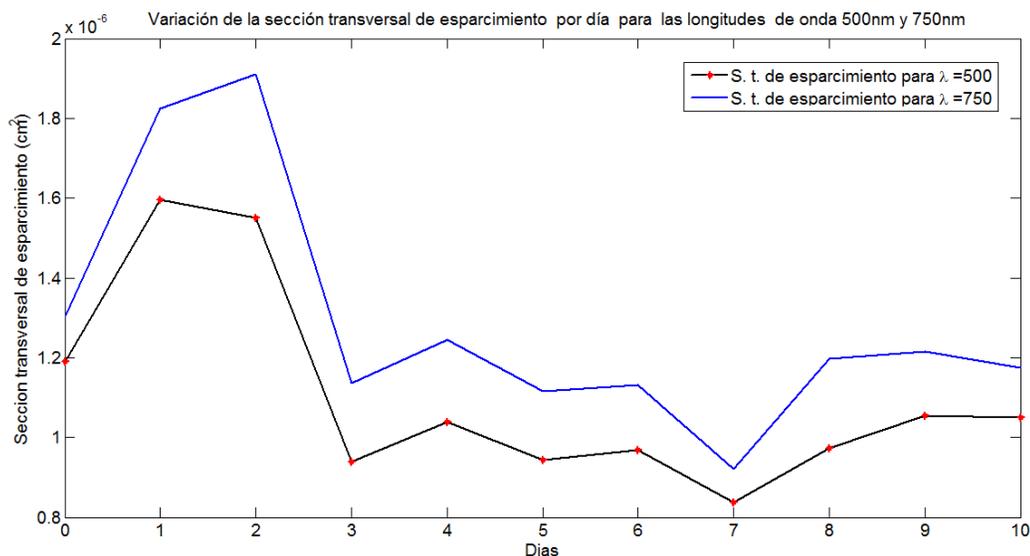


Figura 36. Variaciones de sección transversal de esparcimiento en el rango de $650nm$ a $700nm$, del día 0 al día 10 para cultivos de *Porphyridium cruentum*.

En la figura 37 se presenta la penetración de la luz a través de las muestras de *Porphyridium cruentum* para diferentes longitudes de onda en el rango de radiación fotosintéticamente activa en los días cero, cuatro y ocho. Los datos se obtuvieron utilizando las mediciones de sección trasversal de extinción y las concentraciones de células. Se observó que en el día cero la longitud de penetración es menor a $2cm$, para el día cuatro la longitud de penetración fue cercana a $1.5cm$ y en el día ocho disminuyó hasta $8mm$. La longitud de penetración casi no varía con longitud de onda. La corta longitud de penetración de la luz en la muestra de células posiblemente límite de tasa de crecimiento de las células observar en la figura 21.

4.5.2 Factor de anisotropía

La medición del factor de anisotropía (g) se realizó utilizando el arreglo experimental que se muestra en la figura 29. A partir del séptimo día de crecimiento se realizaron

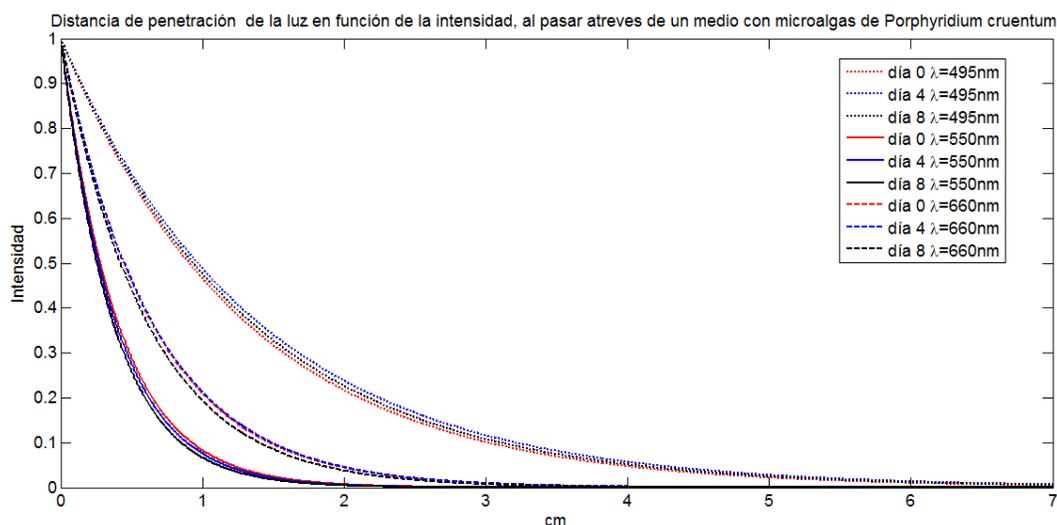


Figura 37. Penetración de la luz a través de las muestras de *Porphyridium cruentum* para las longitudes de onda siguientes: 495nm , 550nm y 660nm , en los días cero, cuatro y ocho.

diluciones para evitar efecto de esparcimiento múltiple. Se utilizó para la medición una celda de 1cm de ancho. La figura 38 muestra las mediciones del factor de anisotropía en $\lambda = 632.8\text{nm}$, para los días 0 – 10 del ciclo de crecimiento del *Porphyridium cruentum*. Se aprecia un decaimiento del día cero al uno, del día uno al tres aumenta rápidamente. Para el cuarto día el factor de anisotropía disminuye. En el quinto día se observa un ligero aumento respecto al cuarto día. Del día cinco al siete el valor del factor de anisotropía baja. Los últimos días (día 8 – 10) el factor de anisotropía aumenta ligeramente.

El cálculo de la incertidumbre para la medición del factor de anisotropía de la figura 38 se realizó utilizando la ecuación 61.

En la tabla 4 se encuentran los valores de factor de anisotropía y densidad volumétrica promedios. Los valores del factor de anisotropía durante los once días varían entre 0.432 ± 0.052 y 0.697 ± 0.026 .

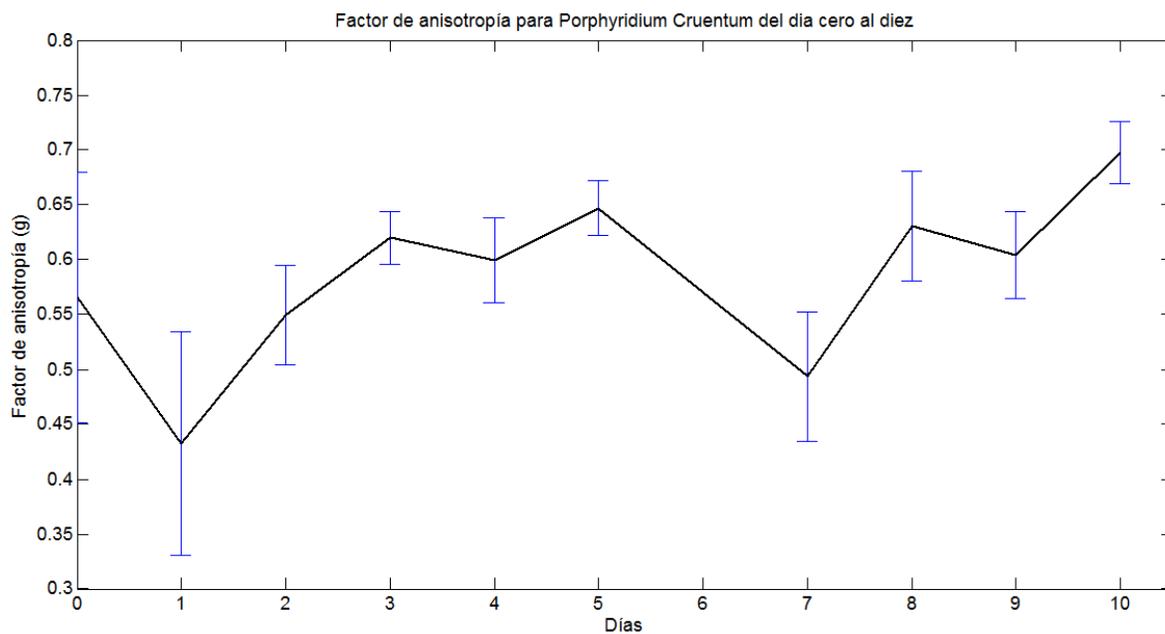


Figura 38. Factor de anisotropía del día cero al diez para cultivos de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 4. Valores promedio del factor de anisotropía en $\lambda = 632.8nm$.

tiempo en días	Factor de anisotropía
0	0.565 ± 0.031
1	0.432 ± 0.052
2	0.549 ± 0.027
3	0.619 ± 0.034
4	0.599 ± 0.048
5	0.647 ± 0.013
7	0.493 ± 0.017
8	0.63 ± 0.035
9	0.604 ± 0.041
10	0.697 ± 0.026

Capítulo 5

Discusión y conclusiones

5.1 Discusión

Entre los principales factores que influyen en la calidad y la cantidad celular de las microalgas figuran la temperatura, la irradiancia, la salinidad, el pH y la limitación de nutrientes (Sommer, 1997). El origen y la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, son factores que influyen directamente en el crecimiento, composición celular, contenido de clorofila, así como en el rendimiento final. En la presente investigación las microalgas crecieron en un ambiente con iluminación constante de $100 \mu Em^{-2}s^{-1}$ proveniente de luz blanca fría de 40W, a una temperatura de $20^{\circ}C$ y utilizando 0.75ml de nutrientes con base en el medio “f” para los 150ml de medio inicial con una densidad celular inicial de $0.573 \times 10^6 \pm 0.0167 \times 10^6 \text{ cel/ml}$.

En la figura 39 se presenta un modelo de la curva del crecimiento detallada descrita en el trabajo de Levert y Xia (2001). En este modelo, el periodo de crecimiento muestra a detalle las fases de adaptación (I), exponencial (II), lineal (III), desaceleración (IV), estacionario (V) y de muerte (VI).

La curva crecimiento de *Porphyridium cruentum*, obtenida en este trabajo (figura 40) nos permite apreciar las tres primeras fases: la fase de adaptación (día cero), la fase exponencial (del día 2 al día 4), y la fase lineal (del día 5 a día 11). En la figura 40 se muestra la curva de crecimiento con los datos anteriores, los puntos azules indican los datos de la medición, la curva roja indica el ajuste para la fase exponencial y la curva negra indica el ajuste para la fase lineal.

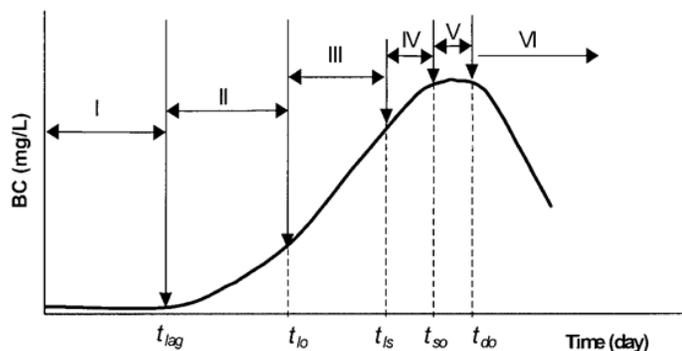


Figura 39. Curva representativa de crecimiento consiste en las fases de adaptación (I), exponencial (II), lineal (III), desaceleración (IV), estacionario (V) y de muerte (VI), donde t_{lag} es el tiempo de transferencia de la fase de adaptación a la fase exponencial, en el que la concentración de biomasa es Cx_0 , t_{lo} es el tiempo de transferencias de crecimiento a partir del tiempo de crecimiento exponencial a la fase lineal, donde la concentración de biomasa es Cx_{lo} , t_{ls} es el tiempo de transferencias de crecimiento a partir de la fase lineal a la fase de desaceleración, t_{so} es el tiempo crítico cuando la fase estacionaria inicia, t_{do} es el tiempo crítico cuando (Levert y Xia, 2001, p. 362).

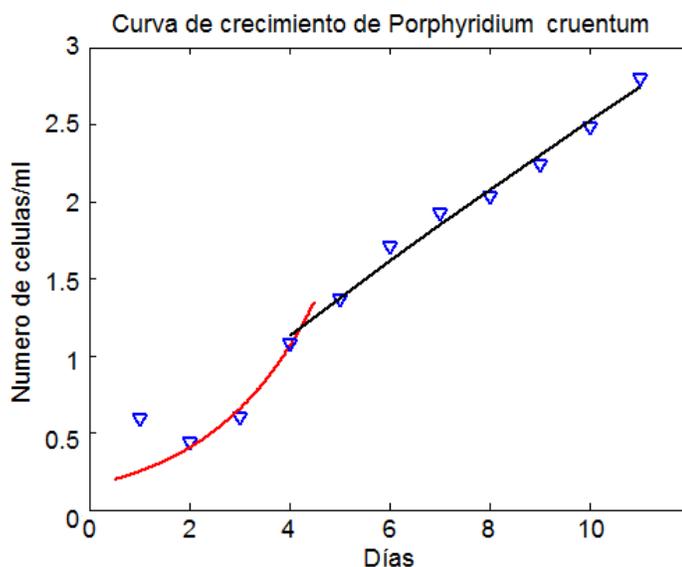


Figura 40. Curva de crecimiento de la microalga *Porphyridium cruentum* con curvas de ajuste para las fases exponencial y lineal.

Con las condiciones del medio ambiente seleccionadas se obtuvieron las siguientes características de crecimiento de cultivo: máxima tasa de crecimiento $\mu = 0.83$, la producción diaria promedio $PD = 0.47$ y el índice de crecimiento en fase exponencial igual a 0.38.

Tabla 5. Densidad celular, parámetros poblacionales promedio y desviaciones estándar entre paréntesis estimados de *Porphyridium cruentum* cultivados en 100ml con medio “f/2”. Los parámetros que describen el crecimiento son: tasa de crecimiento específico (μ), tiempo de duplicación (TD), divisiones por día (D) y producción diaria (PD).

tiempo en días	densidad celular (<i>células/ml</i>)	μ	TD	D	PD
0	1.56 ± 0.24				
1	3.27 ± 0.16	0.74	0.94	1.06	1.71
2	6.9 ± 0.25	0.75	0.92	1.08	3.63
3	10.28 ± 0.43	0.4	1.75	0.57	3.38
4	14.43 ± 0.39	0.34	2.04	0.49	4.15
5	17.94 ± 0.12	0.21	3.33	0.30	3.51
6	19.96 ± 0.19	0.11	6.66	0.15	2.02
7	24.28 ± 1.38	0.2	3.57	0.28	4.32

En comparación se presentan los parámetros de población de la microalga *Porphyridium cruentum* presentados en tesis de González (2006) cultivada en 100ml de agua marina utilizando el medio “f/2”. Las características de población fueron; máxima tasa de crecimiento $\mu = 0.74$, la producción diaria promedio $PD = 0.2426$ y índice de crecimiento en fase exponencial igual a 0.547. En general, se aprecia un comportamiento similar entre los datos presentados en este trabajo de tesis y los obtenidos por González (2006) (ver figura 41).

En la figura 23 se aprecia un aumento de cinco veces la concentración de clorofila *a* por mililitro respecto al valor inicial, como consecuencia del aumento en la concentración de células se genera el fenómeno de auto sombreado, por este motivo la iluminación que recibían las células en el cultivo inicial respecto a la final baja. Este decremento (en la

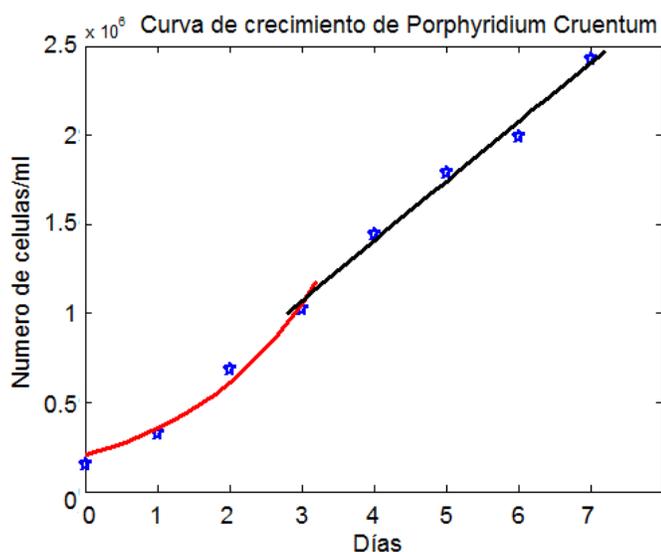


Figura 41. Curva de crecimiento de la microalga *Porphyridium cruentum* creada a partir de los datos de crecimiento de la tabla 5 (línea roja ajuste para la fases exponencial, línea negra ajuste para la fases lineal).

iluminación de las células) se aprecia claramente en la figura 37. La figura muestra que debido a la alta densidad celular la longitud de penetración es corta (menor 2 cm). Una mayor concentración de clorofila permite a las células absorber los pocos fotones que penetran en el medio. En el estudio de López Muñoz *et al.* (1992) encontraron que para las algas *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum*, los contenidos en clorofila para una misma temperatura disminuyen al aumentar la intensidad luminosa. Las mediciones de la concentración de clorofila *a* por célula (ver figura 24) muestran un aumento de solo 1.5 veces respecto al valor inicial durante el crecimiento del cultivo.

Para los carotenoides sucede de forma inversa, cuando la densidad celular es menor, las células reciben más fotones de los que necesitan, entonces para protegerse la célula aumenta la concentración de carotenoides y cuando la densidad celular aumenta y la cantidad de fotones que llega a la célula disminuye la concentración de carotenoides disminuye también. Los trabajos de investigación de Niyogi (1999); Ledford y Niyogi

(2005), sugieren que un aumento en la concentración de carotenoides bajo condiciones de estrés representa un mecanismo que protege a las células del daño ocasionado por la luz.

Las algas rojas, incluyendo al *Porphyridium cruentum*, tienen tres tipos de pigmentos: clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas (ver figura 42). Los picos de absorción corresponden a estos pigmentos se presentan en los espectros de las secciones transversales de absorción medidas.

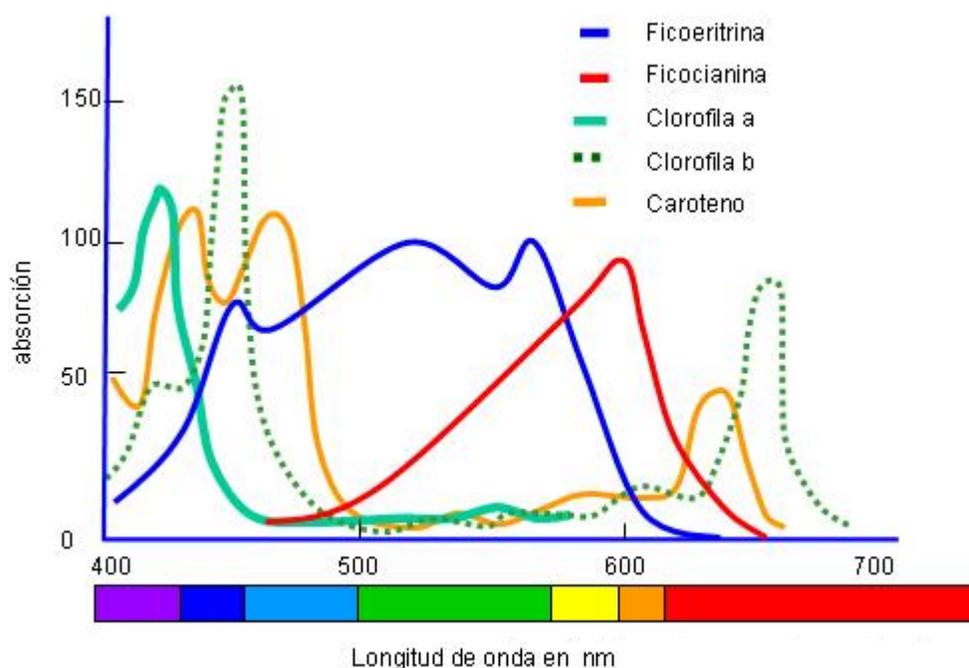


Figura 42. Espectros de absorción de los pigmentos característicos de las microalgas

El esparcimiento y absorción de las partículas juegan papel crítico en la determinación de la variabilidad óptica de la columna de agua, y el cambio de ambiente de la luz bajo el agua influye fuertemente el crecimiento del fitoplancton y micrófitos. En este trabajo de investigación, la absorción y esparcimiento múltiple en las algas determina el crecimiento de cultivo lejano a la fuente de luz.

Tal como se presentó en algunas publicación (Terán, 2010; Sun *et al.*, 2010), la

variación espectral del esparcimiento se asemejan a la variación inversa de la absorción, pero esta tendencia es solo cuando el tamaño de algas está en el intervalo $8 - 10\mu m$, al aumentar el tamaño de microalga el esparcimiento de la luz crece, la sección transversal de esparcimiento sigue la forma y el valor de la sección transversal de extinción.

En nuestros resultados de medición (obtenidos de células de *Porphyridium cruentum* del orden de $8 - 16\mu m$) se aprecia que los valores de las secciones transversales de extinción y esparcimiento, cambia del mínimo $0.9 \times 10^{-6} cm^2$ al máximo $1.95 \times 10^{-6} cm^2$, fueron de un orden mayor a las de secciones transversales de absorción, la cual tiene el valor máximo en $2 \times 10^{-7} cm^2$. Por estos motivos, la mayoría de las curvas de sección transversal de absorción y esparcimiento son suaves y poco influenciadas por la absorción. Sin embargo, un rasgo aparece alrededor del $675 nm$, donde se encuentra uno de los picos de absorción de clorofila *a*.

Los resultados de las mediciones de factor de anisotropía que se presentan en la subsección 3.4.2 muestran que el factor de anisotropía varía desde el mínimo 0.432 ± 0.052 a 0.697 ± 0.026 . En el análisis de esparcimiento simple y múltiple se mostró que a partir del día seis se presenta esparcimiento múltiple en los cultivos, lo que llevaría mediciones ópticas en las que deben utilizarse ecuaciones distintas a las empleadas en este trabajo para su análisis, por este motivo a partir del día seis todas las mediciones ópticas se realizaron empleando diluciones al 50%. Una cantidad significativa de esparcimiento es probablemente la razón por la que la fase exponencial de crecimiento se reduce a tres días. En la literatura (Van de Hulst, 2012) existe otro criterio para evaluar cuando el esparcimiento múltiple es bajo o despreciable. Se dice que esparcimiento múltiple es bajo si el espesor óptico de la muestra es $t = c \cdot l < 0.3$, donde c es la sección transversal de extinción específica (la sección transversal dividida por concentración de clorofila en la célula ($1/m^2 g$) y

$l = 1\text{cm}$, el esparcimiento múltiple es despreciable si $t < 0.1$.

En el análisis de penetración de luz en la muestra (ver figura 37), se aprecia que iluminación que llega a las células ocurre solo a un centímetro para el día cinco y la parte mayor de cultivo está en obscuridad, lo que disminuye el crecimiento de cultivo. En las mediciones de las secciones transversal de extinción y absorción a partir de día seis la concentración de las células fue lo suficiente alta para presentar esparcimiento múltiple, lo que aumenta la retro dispersión.

La longitud de penetración casi no varía con longitud de onda. La corta longitud de penetración de la luz en la muestra de células posiblemente limita la tasa de crecimiento de las células, observar la figura 21.

5.2 Conclusiones

Se presenta un estudio de los propiedades biológicas así como las ópticas de la microalga *Porphyridium cruentum* en el periodo de crecimiento.

Las conclusiones de esta tesis comprenden dos partes: a) lo referente al área biológica y b) propiedades ópticas como absorción y esparcimiento de la microalga en vivo.

a) El área biológica:

Las microalgas crecieron en un ambiente con iluminación constante de $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ proveniente de luz blanca fría de 40W , a una temperatura de 20°C y utilizando 0.75ml de nutrientes con base en el medio “f” para los 150ml de medio inicial, con una densidad celular inicial de $0.573 \times 10^6 \pm 0.0167 \times 10^6 \text{cel}/\text{ml}$.

Los procedimientos para la preparación del cultivo, cálculo de la densidad celular, conservación y mediciones de pigmentos, y análisis de datos se realizaron con la metodología desarrollada en el laboratorio de cultivo de microalgas 2 en el

departamento de Acuicultura. El cálculo de números de células y las propiedades ópticas en vivo se realizaron diariamente de forma rutinaria.

- Una de las metas principales del área biológica fue obtener la curva de crecimiento que es presentada en la figura 20 y muestra la fase de adaptación (día uno y dos), fase de crecimiento exponencial, a partir del día dos hasta el día cuatro y la fase lineal del día cuatro al día diez. En la curva se aprecia un crecimiento aproximadamente lineal.
- La tasa de crecimiento (ver figura 21) mostró un aumento los primeros cuatro días, hasta un nivel máximo de 0.83 ± 0.0407 el día tres y a partir de ese día la curva decrece hasta 0.16 ± 0.015 del día diez. El decremento en la tasa de crecimiento a partir del tercer día coincide con que la fase exponencial termine el día tres. La rápida reducción de la longitud de penetración de luz en medio ambiente del cultivo (ver Figura 37) nos permite explicar el lento crecimiento y la baja variación en tasa de crecimiento. El decremento de la tasa de crecimiento, los dos últimos días, nos permite concluir que la fase estacionaria de la curva de crecimiento era próxima.
- La concentración de clorofila *a* por mililitro aumento cinco veces respecto al valor inicial. El aumento en la concentración se debe a alta densidad celular presente en el cultivo en los últimos días de medición (4.8 veces respecto a la densidad de células inicial). De igual forma hubo un aumento la concentración de la clorofila *a* por célula de 1.5 respecto al valor inicial.
- Los carotenoides presenta variaciones menores debido al aumento en la densidad de las células, para la concentración de carotenoides por célula se aprecia un decremento a partir del día uno.

b) El área óptica:

Los valores de las secciones transversales de extinción y esparcimiento obtenidos durante mediciones de las células en vivo son de un orden mayor a las de sección transversal de absorción, debido al tamaño de las microalgas. La mayoría de las curvas de sección transversal de extinción y esparcimiento son suaves y poco influenciadas por la absorción. Sin embargo, hay un rasgo que se aprecia alrededor del $675nm$, donde se encuentra uno de los picos de absorción de la clorofila *a*.

Las algas rojas que incluyen al *Porphyridium cruentum* tienen tres tipos de pigmentos: clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas. Los picos de absorción corresponden a estos pigmentos se muestran en los espectros de las secciones transversales de absorción medidas. El pico alrededor del $675nm$, corresponde a la clorofila *a*, dos picos en el intervalo de longitud de onda de $450 - 520nm$ y el pico en $630nm$ corresponden a los carotenoides y dos picos en intervalo $520 - 600nm$ son característicos de la ficoeritina.

- Durante el crecimiento de la microalga *Porphyridium cruentum*, las secciones transversales de absorción para una de las bandas de absorción de la clorofila *a* ($\lambda = 660nm$), presentó una variación de $0.64 \times 10^{-7} cm^2$, esta variación se aprecia con mayor claridad del día cero al día cinco ($0.86 \times 10^{-7} cm^2$ a $1.5 \times 10^{-7} cm^2$). A partir de día tres y hasta el día diez, las variaciones fueron menores, entre $0.99 \times 10^{-7} cm^2$ y $1.1 \times 10^{-7} cm^2$. Este resultado nos permite concluir que para la microalga *Porphyridium cruentum*, con las condiciones de ambiente y concentración de nutrientes antes mencionados, las pequeñas variaciones de la sección transversales de absorción para $\lambda = 660nm$, no coinciden con el aumento en la concentración de clorofila *a* obtenidas mediante extracción de pigmentos

con acetona al 90%.

- Para la longitud de onda $550nm$, que corresponde a uno de los picos de absorción de la ficoeritrina, la sección transversal de absorción, presentó una variación de $0.706 \times 10^{-7} cm^2$ entre la mínima de $0.9 \times 10^{-7} cm^2$ el día cero y la máxima sección transversal de absorción de $1.606 \times 10^{-7} cm^2$ el día dos. Se aprecia que las variaciones de la sección transversal de absorción para la longitud de onda $550nm$ coincide con las variaciones del pico de absorción de la clorofila a ($675nm$).
- Dos de los picos de absorción de los carotenoides se encuentran en el intervalo de $400nm - 500nm$. Para $\lambda = 495nm$, el mínimo fue $1.076 \times 10^{-7} cm^2$ el día dos y el máximo fue el día diez con un valor de $1.822 \times 10^{-7} cm^2$. La variación más grande entre un día y otro fue del día cero ($1.187 \times 10^{-7} cm^2$) al día uno ($1.607 \times 10^{-7} cm^2$), y esta variación coincide con que el día cero la concentración de carotenoides por célula fue cero y para el día uno la concentración subió hasta $0.45 \pm 0.0009 \times 10^{-7} \mu g/l$. Del tercer día hasta el décimo día, la variación estuvo entre $1.076 \times 10^{-7} cm^2$ de día siete y $1.285 \times 10^{-7} cm^2$ del día diez, cabe mencionar que el séptimo día ocurrió un aumento en la concentración de carotenoides de $0.8 \pm 0.015 \times 10^{-7} \mu g/l$ el día seis a $1.8 \pm 0.013 \times 10^{-7} \mu g/l$ el día siete y en los días nueve y diez hubo la menor concentración de carotenoides (día nueve $0.114 \pm 0.015 \times 10^{-7} \mu g/l$). Por ello podemos concluir que, la variación de la concentración de carotenoides influye en la sección transversal de absorción para $\lambda = 495nm$.
- Los datos obtenidos para las secciones transversales de extinción y esparcimiento fueron un orden mayor a las de sección transversal de absorción. El día siete fue el día en el que las secciones transversales de extinción y esparcimiento fueron

mínimas coincidiendo con la máxima concentración de carotenoides. Los días dos y tres son los que se encuentran en el máximo, esto debido al cambio brusco en las concentraciones de pigmentos por motivos de adaptación al nuevo medio y a nuevas características de iluminación. En los días nueve y diez las secciones transversales de extinción y esparcimiento, se aproximaron bastante a los valores obtenidos para el día cero.

- Las gráficas de las secciones transversal de absorción normalizada por la integral de las secciones transversales de absorción en el intervalo de longitud de onda de la radiación fotosintéticamente activa (ver figura 34) se observa claramente que, durante de periodo de crecimiento, la absorción de la carotenoides disminuye y al mismo tiempo aumenta la absorción de ficoeritrina.
- El factor de anisotropía presenta variaciones de 0.432 ± 0.052 hasta 0.697 ± 0.026 . Realizando una comparación entre la concentración de carotenoides y los valores del factor de anisotropía, hay una coincidencia entre un cambio brusco en la concentración de carotenoides, hay un aumento de $1.8 \pm 0.013 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$ el día siete, que coincide con una disminución de factor de anisotropía el día siete 0.493 ± 0.017 . Sucede de manera similar para el día uno, cuando se obtiene la mayor concentración de carotenoides por célula ($4.6 \pm 0.01 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{l}$) y el mínimo factor de anisotropía (0.432 ± 0.052). El análisis de esparcimiento simple y múltiple hecho antes de realizar las mediciones nos permite conocer factor de delusión necesaria para reducir la densidad de los células y evitar esparcimiento múltiple. Podemos concluir que las variaciones en la concentración de carotenoides, conllevan a un cambio en el factor de anisotropía de la célula.
- Con base en las mediciones de las secciones transversal de extinción, se obtuvo la

longitud de penetración de la luz en el cultivo, la cual fue de aproximadamente 2cm los primeros días y disminuyó hasta 8mm el día ocho. La corta longitud de penetración es posiblemente, lo que disminuyó la fase exponencial a tres días.

- Utilizando los resultados del factor de anisotropía, tenemos la certeza de que los resultados de las secciones transversales de absorción y esparcimiento, no tienen errores por retro esparcimiento durante las mediciones de las secciones transversales de absorción, ya que todos los resultados del factor de anisotropía son positivos, todo el esparcimiento es hacia adelante.

Capítulo 6

Trabajo a futuro y recomendaciones

6.1 Trabajo a futuro

El trabajo que se presenta en esta tesis puede ser ampliado mediante:

- La medición de las secciones transversales de absorción, extinción, para las distintas etapas de la curva de crecimiento desde la fase estacionaria hasta la fase de muerte, para la microalga *Porphyridium cruentum*. Utilizando las mismas condiciones de iluminación, temperatura y concentración de nutrientes que las presentadas en este trabajo.
- Calcular las secciones transversales y el factor de anisotropía para otras especies de microalga y considerar una etapa específica del crecimiento o todo el ciclo de vida.
- Modificar el área del detector del arreglo experimental para la medición de la sección transversal de extinción.

6.2 Recomendaciones

Para aquellas personas que sientan interés en el tema, hay algunas recomendaciones que serán de gran utilidad para un trabajo futuro.

Área biológica:

- El trabajo en el laboratorio requiere de mucha experiencia para obtener resultados satisfactorios.

- Realizar más de dos conteos celulares de cada muestra, para disminuir la incertidumbre en la medición de la densidad celular, y con ello evitar errores en las secciones transversales.
- Crear más de dos cultivos para asegurar el trabajo en caso de contaminación de alguno de los mismos, y para realizar comparaciones de los resultados.
- En el caso de realizar las mediciones biológicas y ópticas diariamente por un periodo mayor a diez días, utilizar más volumen de medio al iniciar el cultivo o extraer una menor cantidad de muestra.

Área óptica:

- Hacer mediciones de prueba con partículas con parámetros ópticos conocidos.
- Utilizar una fuente de iluminación con potencia suficientemente grande para cubrir el espectro óptico en el visible, para evitar problemas con el traslape del espectro de la muestra y la corriente de oscuridad.
- En el caso de emplear el arreglo para medir la sección transversal de extinción, utilizado en este trabajo (ver figura 27), la alineación correcta del arreglo es de suma importancia, ya que una pequeña variación en la alineación del fotodetector puede producir variaciones en la lectura de este y por ende un error en la medición.

Referencias bibliográficas

- Abdala-Díaz, R., Chabrilion, M., Cabello-Pasini, A., Lopez-Soler, B., y Figueroa, F. (2010). Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of marine macrophage cell line. *Ciencias Marinas*, **36**(4): 345–353.
- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, **25**(2): 207–210.
- Benavente-Valdés, J., Montañez, J., Aguilar, C., Méndez-Zavala, A., y Valdivia, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Acta Química Mexicana*, **4**(7): 12pp.
- Benavides, J. y Rito-Palomares, M. (2004). Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of b-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B*, **807**(1): 33–38.
- Bermejo Román, R., Alvarez-Pez, J., Ación Fernández, F., y Molina Grima, E. (2002). Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, **93**(1): 73–85.
- Bohne, F. y Linden, H. (2002). Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **1579**(1): 26–34.
- Bricaud, A., Bédhomme, A.-L., y Morel, A. (1988). Optical properties of diverse phytoplanktonic species: Experimental results and theoretical interpretation. *Journal of Plankton Research*, **10**(5): 851–873.
- Cortés, M. P., Trujillo, J. G., y Gamboa, J. M. (2008). Simulación del esparcimiento de la luz en medios biológicos mediante el método monte carlo. *Ingeniería*, **12**(2): 57–65.
- Darley, W. M. (1987). *Biología de las algas: enfoque fisiológico*. Limusa, 263pp.
- Gitelson, A. A., Schalles, J. F., Rundquist, D. C., Schiebe, F. R., y Yacobi, Y. Z. (1999). Comparative reflectance properties of algal cultures with manipulated densities. *Journal of Applied Phycology*, **11**(4): 345–354.
- González, J. A. (2006). *Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de Porphyridium cruentum (rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas*. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). Posgrado en Acuicultura. 64 pp.

- Guillard, R. R. y Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: *I. Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology*, **8**(2): 229–239.
- Hannis, K. (2013). *Optical behavior of algae particles in photobioreactors*. Master in science thesis, sustainable energy technology, Faculty of Applied Science, Delft University of Technology (TuDelft). Netherlands. 45 pp.
- Heney, L. G. y Greenstein, J. L. (1941). Diffuse radiation in the galaxy. *The Astrophysical Journal*, **93**: 70–83.
- Hoepffner, N. y Sathyendranath, S. (1991). Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **73**(1): 1–23.
- Jeffrey, S. t. y Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz*, **167**(19): 1–194.
- Lambert, J. H. (1892). *Lamberts Photometrie:(Photometria, sive De mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae)(1760)*. Número 31-33. W. Engelmann.
- Ledford, H. K. y Niyogi, K. K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell & Environment*, **28**(8): 1037–1045.
- Levert, J. y Xia, J. (2001). Modeling the growth curve for spirulina (arthrospira) maxima, a versatile microalga for producing uniformly labelled compounds with stable isotopes. *Journal of applied phycology*, **13**(4): 359–367.
- López Muñoz, I., Abalde, J., y Herrero, C. (1992). Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz.
- Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Gorelova, O. A., Reshetnikova, I. V., Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., y Cohen, Z. (2007). Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) 1. *Journal of phycology*, **43**(4): 833–843.
- Naqvi, K. R., Merzlyak, M., y Melø, T. (2004). Absorption and scattering of light by suspensions of cells and subcellular particles: an analysis in terms of kramers–kronig relations. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **3**(1): 132–137.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual review of Plant Biology*, **50**(1): 333–359.
- Osborne, B. A. y Raven, J. A. (1986). Light absorption by plants and its implications for photosynthesis. *Biological Reviews*, **61**(1): 1–60.

- Parsons, Timothy R. y Strickland, J. D. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research*, **21**(3): 155–163.
- Reboloso Fuentes, M., García Sánchez, J., Fernández Sevilla, J., Acién Fernández, F., Sánchez Pérez, J., y Molina Grima, E. (1999). Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Progress in Industrial Microbiology*, **35**: 271–288.
- Reboloso Fuentes, M., Acién Fernández, G., Sánchez Pérez, J., y Guil Guerrero, J. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, **70**(3): 345–353.
- Richards, F. A. y Thompson, T. G. (1952). The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. ii. a spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *Journal of Marine Research*, **11**(2): 156–172.
- Sommer, U. (1997). Selectivity of *Idothea chelipes* (Crustacea: Isopoda) grazing on benthic microalgae. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1622–1628.
- Sun, D., Li, Y., Wang, Q., Lv, H., Le, C., Huang, C., y Gong, S. (2010). Partitioning particulate scattering and absorption into contributions of phytoplankton and non-algal particles in winter in Lake Taihu (China). *Hydrobiologia*, **644**(1): 337–349.
- Taylor, J. R. (1997). An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements.
- Terán, E. (2010). *Consecuencias del esparcimiento múltiple en la absorción de algunos sistemas biológicos*. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). Posgrado en Óptica. 116 pp.
- Terán, E., Méndez, E. R., Enríquez, S., y Iglesias-Prieto, R. (2010). Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Applied Optics*, **49**(27): 5032–5042.
- Van de Hulst, H. C. (2012). *Multiple light scattering: tables, formulas, and applications*, Vol. 1. Elsevier.