



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACOPLAMIENTO ENTRE CONCENTRACIÓN Y
ATENUACIÓN DE LA LUZ EN LA REGIÓN UV-VIS
EVALUADO EN CONDICIONES CONTROLADAS
USANDO MICROALGAS VERDES**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

PRESENTA:

DANIELA ARIDAI CASTELÁN GARDUÑO

ASESORA:

DRA. LORENA ROMERO SALAZAR

COASESORA:

DRA. MONICA VANESSA GARDUÑO PAZ

TOLUCA, MÉX. MARZO, 2026

Resumen

La atenuación de la luz en cuerpos de agua es un fenómeno físico fundamental que determina la distribución espectral de la radiación disponible. En ecosistemas con alta turbidez, como aquellos dominados por microalgas, los procesos de absorción y dispersión modifican de forma significativa la propagación de la radiación ultravioleta y visible, afectando directamente procesos dependientes de la luz. El presente trabajo caracteriza la atenuación espectral de la radiación UV-VIS (300-800 nm) ocasionada por la microalga verde *Chlorella sp.*.

Se estableció un sistema de cultivo controlado tipo batch para obtener muestras a cuatro concentraciones diferentes. Mediante espectroscopía UV-VIS, se validó la linealidad de la Ley de Beer-Lambert en el sistema ($R^2 > 0.99$), lo que permitió determinar el coeficiente espectral de absorción de la microalga. Los resultados muestran que *Chlorella sp.* actúa como un filtro selectivo, con coeficientes de absorción relativamente estables del orden de $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ cel}^{-1}$. Se observó una fuerte extinción de la radiación en las bandas azul (445 nm), roja (685 nm) y en la región UV-A.

El modelo de la irradiancia espectral relativa en función de la profundidad indica que, bajo escenarios de alta densidad algal ($2.945 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$), la profundidad crítica ($z_{10\%}$) en la región ultravioleta es de aproximadamente 4.3 cm, reduciendo drásticamente el horizonte óptico efectivo. Este estudio proporciona una base biofísica cuantitativa para comprender cómo la eutrofización compromete la viabilidad de especies visualmente dependientes mediante el bloqueo selectivo del espectro electromagnético.

Abstract

Light attenuation in aquatic environment is a fundamental physical phenomenon that determinates the spectral distribution of available radiation. In highly turbid ecosystems, such as those dominated by microalgae, absorption and scattering processes significantly modify the propagation of ultraviolet and visible radiation, directly affecting light-dependent processes. This work characterizes the spectral attenuation of UV-VIS radiation (300-800 nm) caused by green microalgae *Chlorella sp.*

A controlled batch-type cultivation system was established to obtain samples at four different concentrations. UV-VIS spectrophotometry was used to validate the linearity of the Beer-Lambert law in the system ($R^2 > 0.99$), enabling the determination of the spectral absorption coefficient of the microalgae as a function of wavelength. The results show that *Chlorella sp.* Behaves as a selective optical filter, with relatively stable absorption coefficients on the order of $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ cell}^{-1}$. A strong extinction of radiation was observed in the blue (445 nm), red (685 nm), and UV-A regions.

Modeling of the relative spectral irradiance as a function of depth indicates that, under high algal density conditions ($2.945 \times 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$), the critical depth ($z_{10\%}$) in the ultraviolet region is approximately 4.3 cm, drastically reducing the effective optical horizon. This study provides a quantitative biophysical framework to understand how eutrophication compromises the viability of visually dependent species through the selective attenuation of the electromagnetic spectrum.

Índice

1	Introducción.....	6
2	Antecedentes	9
3	Marco teórico	12
3.1	Espectro electromagnético	12
3.1.1	Luz visible	12
3.1.2	Radiación ultravioleta	12
3.2	Interacción entre la luz y la materia.....	13
3.2.1	Configuración atómica	13
3.2.2	Configuración molecular.....	16
3.2.3	Absorción	19
3.2.4	Dispersión elástica.....	20
3.3	Espectroscopía UV-VIS.....	21
3.3.1	Irradiancia espectral.....	21
3.3.2	Transmitancia espectral.....	23
3.3.3	Absorbancia y espectro de absorción.....	23
3.3.4	Ley de Beer-Lambert	25
3.4	Microalgas verdes: <i>Chlorella sp.</i>	26
3.4.1	Descripción general.....	26
3.4.2	Pigmentos fotosintéticos	27
3.5	Absorbancia como indicador de la atenuación de la luz	28
4	Marco experimental	31
4.1	Consideraciones generales del diseño experimental.....	31
4.2	Estrategia de obtención y selección de la microalga.....	31
4.3	Selección y justificación del medio de cultivo	32
4.4	Consideraciones para el mantenimiento y estabilidad del cultivo.....	32
4.5	Preparación para la fase de medición óptica	33
5	Resultados y análisis.....	34
5.1	Parámetros físico-ambientales del experimento.....	34
5.2	Caracterización morfológica de las muestras.....	38
5.3	Determinación de la concentración celular	40
5.4	Espectros de absorción del sistema experimental	42
5.4.1	Espectros de controles: Agua desionizada y Medio de cultivo	42

5.4.2	Espectro de absorción de <i>Chlorella sp.</i> in vivo	44
5.5	Curvas de calibración: relación entre la absorbancia y la concentración	46
5.5.1	Calibración con datos espectrales directos.....	47
5.5.2	Corrección de la dispersión y calibración mejorada	49
5.6	Cálculo del coeficiente espectral de absorción	50
5.6.1	Metodología del cálculo	51
5.6.2	Análisis del espectro de coeficiente de absorción	51
5.7	Análisis de atenuación espectral de la luz	54
5.7.1	Evolución de la irradiancia espectral con la profundidad	54
5.7.2	Profundidad crítica de visión.....	56
6	Conclusiones.....	58
7	Glosario biológico.....	61
8	Apéndices	63
	Apéndice A: Deducción de ecuaciones para la Irradiancia espectral incidente generada por un espectrofotómetro con Monocromador	63
	A.1 Conceptos previos	63
	A.2 Ecuación A: Cálculo directo a partir del flujo radiante espectral	67
	A.3 Ecuación B: Cálculo a partir de la potencia total y parámetros del sistema	68
	Apéndice B: Ley de Beer-Lambert.....	69
	Apéndice C: Deducción para estimar la irradiancia espectral relativa a distintas profundidades usando absorbancia espectral.	71
	Apéndice D: Procedimientos experimentales para la preparación, mantenimiento y análisis de cultivos de <i>Chlorella sp.</i>	75
	D.1 Ensamblaje del sistema de cultivo tipo batch.....	75
	D.2 Protocolo de aislamiento y selección de cuasi monocultivo microalgal.....	76
	D.3 Preparación de medio de cultivo Basal de Bold	79
	D.4 Mantenimiento de cultivos en condiciones controladas	81
	D.5 Preparación y manejo de muestras para análisis óptico	82
	Apéndice E: Sistema de monitoreo ambiental con Arduino IoT Kit.	84
	Apéndice F: Programa para el cálculo de coeficientes de absorción	86
	Apéndice G: Programa para el cálculo de la irradiancia espectral relativa (atenuación de la luz).....	89
9	Bibliografía	93

1 Introducción

La luz es uno de los factores ambientales más determinantes en los ecosistemas acuáticos. No solo constituye la fuente primaria de energía para la producción de biomasa a través de la fotosíntesis, sino que también actúa como el principal canal de información para una gran diversidad de organismos que dependen de la visión para alimentarse, orientarse y reproducirse. Sin embargo, la propagación de la radiación electromagnética en el agua no es un proceso pasivo, está gobernada por fenómenos físicos de absorción y dispersión que modifican tanto la intensidad como la composición espectral de la luz conforme esta se propaga en el medio.

En cuerpos de agua dulce, particularmente aquellos impactados por actividades antropogénicas, la calidad óptica del medio suele verse comprometida por el aumento de turbidez. Desde el punto de vista físico, la turbidez puede entenderse como la presencia de partículas suspendidas que interactúan con la radiación incidente, reduciendo la fracción de la luz que logra propagarse de manera directa. Aunque esta turbidez puede ser causada por sedimentos inorgánicos, la turbidez de origen biológico, asociada a la eutrofización, presenta una complejidad óptica mayor. Esto se debe a que los microorganismos no solo dispersan luz por su tamaño micrométrico, sino que además la absorben de manera selectiva en longitudes de onda específicos debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos.

Las microalgas verdes, como *Chlorella sp.*, contienen pigmentos cuya respuesta espectral se concentra principalmente en las regiones azul y roja del espectro visible, así como en el ultravioleta cercano. En consecuencia, un incremento en su concentración no solo reduce la cantidad total de radiación disponible, sino que altera de forma selectiva la calidad espectral de la luz en el medio acuático. Este efecto resulta relevante en sistemas donde pequeñas variaciones en la concentración de microalgas o en la distancia recorrida por la luz pueden generar cambios significativos en el entorno óptico.

La modificación espectral de la radiación cobra importancia en el contexto de la conservación de especies endémicas. Tal es el caso del Mexclapique de Lerma (*Girardinichthys multiradiatus*), un pez nativo de la cuenca alta del río Lerma en México. Estudios previos han demostrado que la selección sexual en esta especie está fuertemente mediada por señales visuales, ya que las hembras muestran preferencia por machos que exhiben coloraciones específicas perceptibles tanto en el rango visible como en el ultravioleta cercano. Por lo tanto, cualquier alteración en la disponibilidad de estas longitudes de onda en el medio acuático puede interferir con los mecanismos de reconocimiento y elección de pareja, comprometiendo la viabilidad poblacional de la especie.

A pesar de la relevancia de este problema, la evaluación de la calidad óptica del agua suele limitarse a la medición de la turbidez en unidades nefelométricas (NTU), un parámetro que cuantifica la dispersión global pero que no proporciona información sobre la absorción espectral ni sobre qué regiones del espectro electromagnético son más afectadas. Para comprender de manera más profunda como la eutrofización modifica el entorno visual del ecosistema, es necesario adoptar un enfoque físico que describa la interacción entre la luz y la materia.

El presente trabajo de tesis aborda esta problemática desde la física experimental, utilizando a la microalga verde *Chlorella sp.* como sistema modelo. El objetivo principal es caracterizar el acoplamiento entre la concentración celular y la atenuación de la radiación en la región UV-VIS bajo condiciones controladas de laboratorio. Mediane espectroscopía UV-VIS y la aplicación de modelos basados en la ley de Beer-Lambert, se busca determinar propiedades físicas intrínsecas del sistema, como el coeficiente de absorción, y analizar como la densidad algal filtra selectivamente el espectro electromagnético.

Este enfoque permite modelar la atenuación relativa de la irradiancia en función de la distancia recorrida por la luz y estimar escalas características, como la profundidad crítica a la cual ciertas regiones espectrales se ven fuertemente reducidas. De esta

manera, el estudio proporciona una base cuantitativa para evaluar como la turbidez de origen biológico puede modificar el entorno óptico y afectar procesos visuales en especies sensibles a la radiación UV-VIS.

2 Antecedentes

La turbidez es una propiedad óptica del agua que describe su capacidad de dispersar y/o absorber la luz debido a la presencia de partículas suspendidas, reduciendo así la cantidad de luz que se transmite en línea recta a través de dicho medio. Se mide en Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) usando un turbidímetro, el cual cuantifica la luz dispersada a 90° con respecto al haz incidente [1].

En muchos cuerpos de agua se presentan altos niveles de turbidez generados por condiciones debidas al cambio climático y a la contaminación de los ecosistemas acuáticos. Una de las consecuencias es que el agua al presentar alta turbidez no permite la suficiente exposición de los peces a la radiación electromagnética, contribuyendo a la disminución o alteración de eventos de selección sexual afectando el proceso de reproducción. Entre los factores biológicos de interés que provocan turbidez en los cuerpos de agua se encuentran las microalgas verdes, las cuales proliferan por la eutrofización, provocando además hipoxia en los peces [2].

Algunos autores evalúan el nivel de turbidez en función de la densidad de microalgas, por ejemplo, en la referencia [3], analizan cuantitativamente cómo la presencia de *Chlorella sp.* afecta las mediciones de turbidez mediante absorbancia, y mejora la precisión de esas mediciones en agua con partículas suspendidas. Sugieren que en ambientes naturales o muestras con microalgas, medir turbidez por absorbancia puede llevar a sesgos, y hace falta calibración específica para tener estimaciones confiables de partículas suspendidas u otros constituyentes.

En [4], desarrollan una metodología rápida y práctica para estimar la concentración de microalgas en cultivo mediante mediciones de turbidez (y las correlacionan con conteos al microscopio) estableciendo ecuaciones de regresión lineal entre turbidez y concentración celular. Esto permite estimar rápidamente la biomasa algal en cultivos sin tener que hacer conteos microscópicos continuamente. Sin embargo, las ecuaciones deben adaptarse para cada especie (por tamaño, morfología, pigmentación) y dentro

del rango de turbidez válido.

Los cambios en la cantidad y variedad espectral de la luz bajo el agua como resultado de una elevada turbidez afectan la visión ecológica de peces que dependen de esta para sobrevivir y reproducirse. En [5] observan en su método experimental que los peces de las especies sardinita esmeralda (*Notropis atherinoides*) y lucioperca (*Sander vitreus*) tienen un umbral de detección visual el cual empeora en presencia de algas más que bajo turbidez sedimentaria. Además, en [6] exponen al pez espinoso de tres espinas (*Gasterosteus aculeatus*) a un “ataque” de un depredador aéreo simulado bajo agua clara vs turbia (cianobacterias); en esta última los peces muestran respuestas antipredatorias menos adecuadas durante la alimentación ya que evalúan peor el riesgo. En [7] observaron que el espinoso prefiere la turbidez por algas, aunque estas sean tóxicas, porque lo utilizan como refugio contra depredadores. En muchas otras especies se ha encontrado que el tipo y el grado de turbidez afectan el crecimiento y mortalidad de los peces porque estos llegan a la inanición [8], en algunas otras la turbidez inducida por algas altera el tipo de dieta de los peces [9], también que les genera estrés fisiológico alterando las concentraciones de cortisol, glucosa y lactato [10], más aún en varios casos se ha reportado que la turbidez condiciona el éxito de apareamiento y el cuidado parental [11]. Por ejemplo, en el caso de la especie del pez amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*), se ha reportado la alteración de conductas de cortejo y selección sexual debido a los diferentes niveles de turbidez, una de las causas por las que esta especie está en peligro de extinción [2] en sus hábitats naturales.

El pez amarillo o Mexclapique de Lerma es una referencia en el presente estudio ya que es una especie endémica de la zona centro de México considerada en estado de conservación [12]. En el artículo “Ultraviolet-based female preferences in viviparous fish” [12], se menciona que, durante el apareamiento, las hembras tienen preferencias por los machos que presentan patrones coloridos, esto debido a la exposición a radiación electromagnética. Este artículo demuestra que la región del espectro electromagnético en el ultravioleta cercano y el visible influye en la coloración del pez

macho y, por lo tanto, en la elección de pareja de las hembras.

Los resultados obtenidos en la tesis “Efecto de la turbidez en el comportamiento de selección sexual de *Girardinichthys multiradiatus*, (Meek, 1904) (Pisces: Goodeidae) en la Microcuenca Toluca-Ixtlahuaca” [2], exponen que “...la turbidez tiene efecto significativo en la preferencia femenina y en el comportamiento de cortejo de los machos...”.

3 Marco teórico

3.1 Espectro electromagnético

El espectro electromagnético es la clasificación de todos tipos de radiación electromagnética según su frecuencia y longitud de onda [13] [14]. Los tipos de radiación electromagnética son: rayos γ , rayos X, ultravioleta, luz visible, infrarrojo, microondas y radiofrecuencia [15]. El enfoque de esta tesis es la región UV-VIS (ultravioleta – luz visible) y con el propósito de simplificar su redacción se le referirá como luz.

3.1.1 Luz visible

Luz visible es aquella región del espectro electromagnético a la cual el ojo es sensible y abarca longitudes de onda que fluctúan entre 400 nm (violeta) a 700 nm (rojo) [16]. Es producida por la reorganización de los electrones exteriores en los átomos y moléculas [17] [15].

3.1.2 Radiación ultravioleta

El rango de la longitud de onda de la radiación ultravioleta (UV) es de 400 nm a 0.6 nm aproximadamente [17]. La región de 400 – 100 nm de la luz UV puede ser subdividida de la siguiente manera: UV-A (315-400 nm aprox.), UV-B (280-315 nm aprox.) y UV-C (280 – 100 nm aprox.) [18]. Otra forma de subdividir la región de 400 – 10 nm de la radiación UV es: ultravioleta cercano (200 – 400 nm) y ultravioleta lejano (10 – 200 nm) [14]. En esta tesis, la región de interés del espectro electromagnético es el ultravioleta cercano.

Los rayos ultravioleta causan daño en la piel de los seres humanos por ser altamente energéticos, además son muy poco visibles al ojo humano ya que las longitudes de onda cortas son absorbidas por la córnea y el cristalino. Sin embargo, existe una gran cantidad de animales que tienen la capacidad de ver la luz UV y/o responder fisiológicamente. Estudios realizados en varias especies de peces han demostrado que la piel de estos refleja picos de luz UV y es percibido en la retina de sus ojos, lo cual

influencia en contextos sociales y de apareamiento. La sensibilidad a la radiación UV en la retina de los peces teleósteos se ha medido que alcanza su punto máximo en 360 nm aproximadamente [12] [15] [17].

3.2 Interacción entre la luz y la materia

La dualidad onda-partícula establece que todas las partículas pueden exhibir simultáneamente propiedades de ondas y partículas, dependiendo de cómo se midan [19]. Esta propiedad es conveniente para poder entender las secciones de este capítulo aplicadas principalmente a los electrones y la luz.

La teoría corpuscular nos dice que la luz fluye concentrada en regiones discretas sin masa denominadas cuantos, las cuales contienen energía igual a $E = h\nu$, ecuación que relaciona la energía del cuanto con su frecuencia, a estos cuantos se les conocen como fotones y son estos los responsables de atribuir a la luz las propiedades de partícula. Cuando hablamos de la energía de la luz es más intuitivo usar los fotones que la onda de la luz para describirla [19].

3.2.1 Configuración atómica

Cada átomo consiste en un núcleo de carga positiva rodeado por cargas negativas, los electrones. La distribución de los electrones de un átomo obedece el principio de exclusión de Pauli, el cual dice, según [20], que “dos electrones no pueden ocupar simultáneamente el mismo estado cuántico en el mismo átomo. Solo puede haber un electrón ocupando un estado con $n_i, l_i, m_{l_i}, m_{s_i}$ ”. Los átomos tienen una estructura ordenada, la cual principalmente tiene niveles de energía u órbitas dependiendo de la energía del átomo, cada uno de estos niveles son representados por el número cuántico principal n , siendo $n = 1$ el menor nivel permitido, y conforme n aumenta el orbital se aleja más del núcleo. Cada órbita tiene a su vez subniveles de energía, o subórbitas, definidos por el número cuántico azimutal l , el cual toma los valores $l = 0, 1, 2, \dots, n-1$, representados por las letras s, p, d y f (continuando con g, h, i, ... de ser necesario).

Dentro de cada subnivel, los electrones ocupan su lugar en los orbitales, definidos por el número cuántico magnético m_l , tomando los valores $m_l = -l, \dots, l$. Cada orbital puede ser ocupado a lo más por dos electrones con spin opuesto, definidos por el número cuántico de espín m_s , uno con espín $\frac{1}{2}$ (up) y otro con espín $-\frac{1}{2}$ (down). Con lo anterior se puede escribir la configuración electrónica de cada átomo usando la distribución de los electrones de cada subórbita establecida la siguiente forma: $(n \ l)^\#$, siendo $\#$ el número de electrones en los orbitales [20] [21] [22].

De lo anterior, es importante destacar que los orbitales representan las regiones en las que es más probable encontrar un electrón en un átomo, siendo, entonces, los estados cuánticos o funciones de estado (o funciones de onda) la representación probabilística de un orbital atómico [23]. Estos orbitales tienen una forma y orientación específica en el espacio tridimensional, las cuales dependen de la subórbita. Los orbitales de la subórbita s tienen forma esférica y por lo tanto no tiene una orientación direccional definida, solo puede haber un orbital por órbita ($m_l = 0$), vea la figura 1. Los orbitales de la subórbita p tienen forma bilobular (pares de lóbulos dispuestos en forma de mancuerna), cada uno de los tres existentes ($m_l = 1, 0, -1$) está orientado en un eje del plano cartesiano, es decir, p_x , p_y y p_z , vea la figura 2. Los cinco orbitales de la subórbita 3d ($m_l = 2, 1, 0, -1, -2$) tienen forma de trébol (cuatro lóbulos o dos bilóbulos colocados perpendicularmente en un mismo plano) o con anillos; los primeros tres están representados con el trébol y orientados sobre los planos x-y, x-z y y-z, es decir, $3d_{xy}$, $3d_{xz}$ y $3d_{yz}$, el cuarto orbital, $3d_{x^2-y^2}$, está formado por dos bilóbulos, uno a lo largo del eje x y otro a lo largo del eje y, y el quinto orbital, $3d_{z^2}$, está formado por un bilóbulo sobre el eje z y un anillo sobre el plano x-y, vea la figura 3 [22] [24] [25] [26].

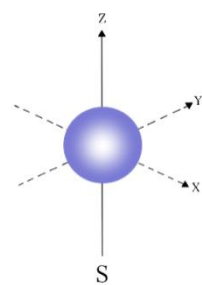


Figura 1: Representación de los orbitales atómicos s.

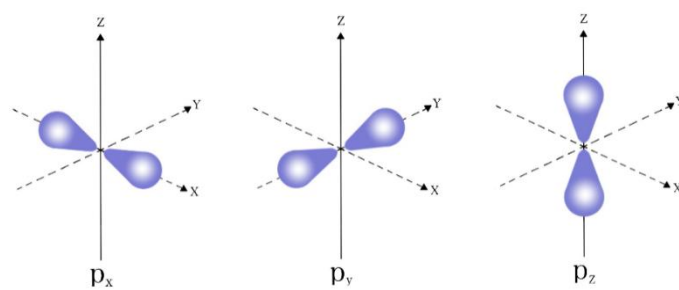


Figura 2: Representación de los orbitales atómicos p.

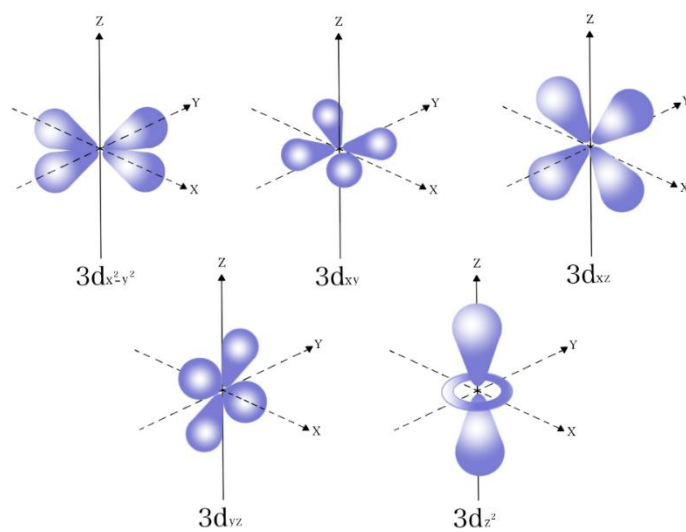


Figura 3: Representación de los orbitales atómicos 3d.

Una configuración electrónica es estable cuando su energía total es constante y por lo tanto corresponde a una distribución de mínima energía, es decir, cada electrón está distribuido en los menores niveles de energía que les sean permitidos. A esta configuración se le conoce como estado fundamental o basal. La configuración electrónica en su estado fundamental, por ejemplo, del oxígeno es $(1s)^2 (2s)^2 (2p)^4$, el cual tiene 8 electrones, y del argón $(1s)^2 (2s)^2 (2p)^4 (3s)^2 (3p)^6$, el cual tiene 18 electrones. De este ejemplo podemos introducir la notación abreviada de la configuración electrónica, la cual se usa cuando se han completado anteriormente órbitas, por ejemplo, para el oxígeno es $[\text{He}] (2s)^2 (2p)^4$ y para el argón escribimos $[\text{Ne}] (3s)^2 (3p)^6$, ya que el helio completa la órbita $n = 1$ con 2 electrones y el neón completa la órbita $n = 2$ con 10 electrones, y a su vez el argón completa la órbita $n = 3$, por lo tanto se podrá usar $[\text{Ar}]$ para abreviar la configuración electrónica de los primeros 18 electrones en las notaciones de los siguientes elementos en la tabla periódica hasta completar $n = 4$, y así sucesivamente [21] [15] [17].

3.2.2 Configuración molecular

Las moléculas están conformadas por átomos, los cuales necesitan enlaces químicos para mantenerse unidos. Los electrones de valencia de los átomos determinan el tipo de enlace que forman entre ellos. Los enlaces principales son: enlace iónico y enlace covalente. El enlace iónico resulta al transferir uno o más electrones de un átomo o grupo de átomos a otro. El enlace covalente se forma cuando un par de átomos comparten uno o más pares de electrones [23] [27].

La teoría de los orbitales moleculares (OM) establece, según [23], que “la combinación de orbitales atómicos en átomos diferentes forma orbitales moleculares, de modo tal que los electrones que los ocupan pertenecen a la molécula como un todo”. Esta teoría se centra en los enlaces covalentes, pues fue desarrollada para describir la configuración electrónica de las moléculas a través de la combinación de orbitales atómicos.

De igual manera que con los orbitales atómicos, los orbitales moleculares son

representados probabilísticamente por las funciones de estado o funciones de onda, las cuales nos dice la región en el espacio en la que es más probable encontrar un electrón de valencia en una molécula. Esta función de estado es resultado de la combinación de, al menos, dos funciones de estado de orbitales atómicos de átomos separados. Este proceso matemático de combinación de orbitales atómicos para generar orbitales moleculares se le conoce como combinación lineal de orbitales atómicos. Por la dualidad onda-partícula de los electrones, cuando las funciones de onda se superponen en fase (matemáticamente, funciones con el mismo signo), da a lugar una interacción constructiva, la cual resulta en reforzamiento entre sí en la región entre los dos núcleos, aumentando la probabilidad de densidad electrónica en esa región, produciendo así un orbital molecular enlazante y con baja energía orbital (orbital estable). Cuando los orbitales se superponen fuera de fase (matemáticamente, funciones con diferente signo) resulta en una interacción destructiva, la cual produce que se cancelen mutuamente en la región entre los núcleos reduciendo las probabilidades de encontrar los electrones en esa región, produciendo de esta manera un orbital molecular antienlazante y con mayor energía (orbitales menos estables y repulsivos). Además, en algunas moléculas orgánicas, hay átomos que poseen electrones que no permiten un enlace efectivo con otro átomo el cual no contribuye en la estabilidad o inestabilidad de la molécula, formando entonces un orbital no enlazante (n). Estos electrones que no participan en los enlaces están alrededor de átomos como oxígeno, nitrógeno, azufre y halógenos [28] [23].

Los orbitales moleculares σ pueden ser formados por dos orbitales atómicos s, o por un orbital atómico s y un orbital p, o por dos orbitales p con un eje de simetría colineal (por ejemplo, dos orbitales p_x), los cuales pueden ser orbitales enlazantes, σ , o antienlazantes, σ^* , vea la figura 4. El enlace resultante es un enlace σ . Los orbitales moleculares π son formados por dos orbitales atómicos p superpuestos lateralmente (por ejemplo, dos orbitales p_y o dos orbitales p_z), los cuales pueden ser enlazantes, π , o antienlazantes, π^* , vea la figura 5. El enlace resultante es un enlace π [29] [23].

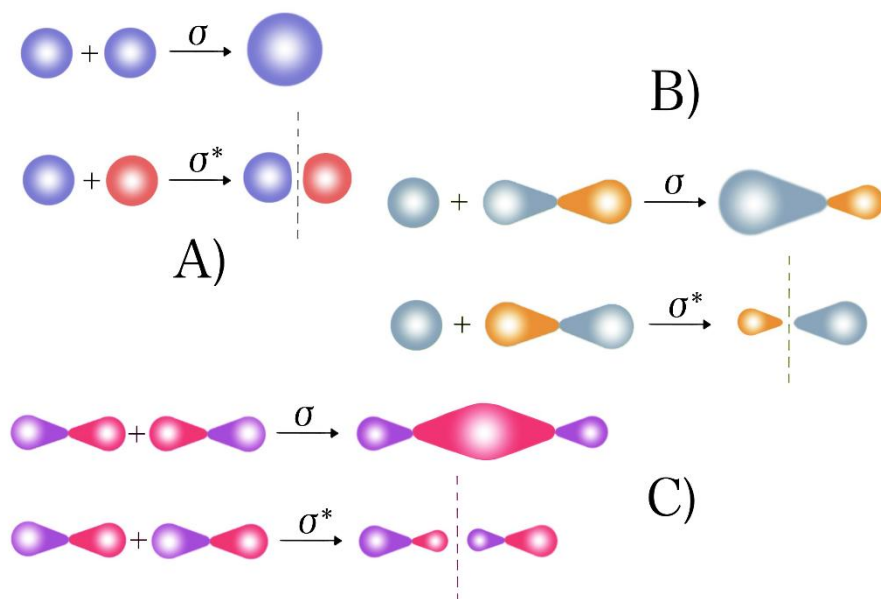


Figura 4: Representación de los orbitales moleculares σ . La combinación de orbitales es representada con colores para denotar si la interacción es constructiva (mismo color) o destructiva (diferente color). A) Orbital enlazante y antienlazante producido por dos orbitales atómicos s . B) Orbital enlazante y antienlazante producido por un orbital atómico s y un orbital p . C) Orbital enlazante y antienlazante producido por dos orbitales p_x .

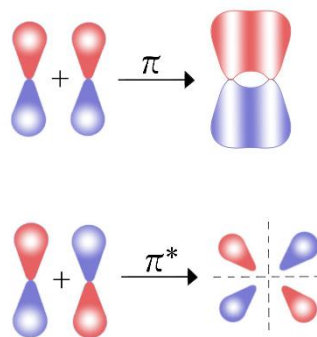


Figura 5: Representación de los orbitales moleculares π . La combinación de orbitales es representada con colores para denotar si la interacción es constructiva (mismo color) o destructiva (diferente color). A) Orbital enlazante y antienlazante producido por dos orbitales atómicos p_y . B) Orbital enlazante y antienlazante producido por dos orbitales atómicos p_z .

Los orbitales moleculares dependen del grado de compartición de electrones entre átomos. En un enlace simple, el cual se forma cuando dos átomos comparten un par de electrones, se compone solo de un enlace σ . Un enlace doble, formado por dos átomos que comparten dos pares de electrones, está compuesto por un enlace σ y un enlace π .

El enlace triple se forma cuando dos átomos comparten tres pares de electrones, el cual está compuesto por un enlace σ y dos enlaces π [30].

3.2.3 Absorción

Los átomos poseen niveles de energía electrónica bien definidos, es decir, su energía está cuantizada. Cuando un átomo en su estado fundamental interactúa con la radiación electromagnética, puede absorber un fotón solo si la energía de este es exactamente igual a la diferencia entre el estado fundamental y un nivel de energía superior. Si esta condición se cumple, ocurre un salto cuántico: un electrón es promovido de su nivel fundamental a uno con un nivel energético más alto equivalente a la energía absorbida, y se dice que el átomo está excitado o que ha pasado a un estado excitado. Si se hace incidir energía de la región UV-VIS, las transiciones más comunes son realizadas por los electrones más externos del átomo, conocidos como los electrones de valencia. Después de un tiempo, aproximadamente del orden de 10^{-8} s, el átomo se relaja y regresa a su estado de menor energía liberando la energía previamente absorbida [15] [16].

La energía de una molécula está compuesta por la suma de la energía electrónica, la vibracional y la rotacional. La primera está asociada a la energía de los electrones en los orbitales de la molécula, resultado de su movimiento y de las interacciones de atracción con los núcleos y repulsión entre sí. Por su parte, la energía vibracional se refiere a la energía debido al movimiento de oscilación de los átomos en torno a sus posiciones de equilibrio dentro de la molécula. Finalmente, la energía rotacional es ocasionada por los movimientos de rotación de la molécula como un todo en el espacio [31].

Esta estructura de niveles energéticos discretos gobierna la interacción de la molécula con la luz. En el caso de las transiciones electrónicas, cuando sobre una molécula incide energía electromagnética, esta absorbe la energía y pueden dar paso una transición electrónica si dicha energía es exactamente la requerida para realizar un salto cuántico de un electrón en un orbital molecular en su estado base a un orbital desocupado con mayor energía. A esta molécula entonces se le dice que está en un estado excitado. Las transiciones electrónicas son originadas por radiaciones de luz visible o ultravioleta. Al

ser inestable, la molécula excitada tiende a relajarse para regresar a su estado fundamental, liberando la energía previamente absorbida [29] [32].

Debido a la energía de los orbitales enlazantes, no enlazantes y antienlazantes, se deduce que las transiciones electrónicas son promovidas de los orbitales enlazantes y no enlazantes a los orbitales antienlazantes. Tenemos, entonces, cinco tipos de transiciones electrónicas y su energía de transición sigue el siguiente orden: $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi < \sigma \rightarrow \sigma^*$, vea la figura 6. Para poder provocar la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se requiere grandes cantidades de energía que solo la región ultravioleta lejano puede brindar. La transición más importante es $n \rightarrow \pi^*$, ya que un electrón es transferido del orbital del átomo no enlazante al orbital antienlazante y la energía utilizada es la menor de las cinco transiciones, por lo tanto, es producida por longitudes de onda más grandes [29] [33].

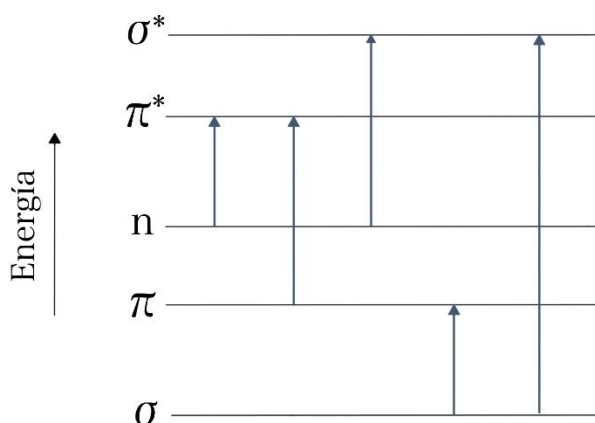


Figura 6: Niveles de energía de los orbitales moleculares y las transiciones electrónicas posibles

3.2.4 Dispersión elástica

La dispersión, scattering en inglés, es un proceso en el cual las partículas u ondas se desvían de su trayectoria original en múltiples direcciones al interactuar con partículas u obstáculos. Cuando esto se realiza sin alterar su energía se dice que es una dispersión elástica. [34] [35].

El scattering a nivel atómico o molecular ocurren del mismo modo. Cuando un átomo, o molécula, en su estado fundamental, interactúa con un fotón con energía insuficiente para producir un salto cuántico a un estado excitado, este absorberá brevemente la energía sin provocar una transición electrónica, e inmediatamente reemite el fotón a otra dirección con la misma energía incidente [15].

Este fenómeno depende de la longitud de la onda de la energía incidente y el tamaño de las partículas dispersoras. Cuando el tamaño de estas partículas es considerablemente más pequeño de tamaño que la longitud de la onda de la radiación (aproximadamente $\lambda/10$), el porcentaje de dispersión de la energía es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda ($1/\lambda^4$), a esto se le llama dispersión de Rayleigh [15] [34]. Cuando el tamaño de las partículas dispersoras son de tamaño comparable o mayor que la longitud de onda incidente, ocurre la dispersión de Mie, el cual es mínimamente dependiente de la longitud de onda, y totalmente independiente para los casos con partículas de tamaño superior. Mientras más grande y esférica la partícula más dispersa la luz hacia adelante, es decir, hacia la dirección de propagación de la luz incidente [15] [36].

3.3 Espectroscopía UV-VIS

La espectroscopía en la región UV-VIS es una técnica empleada para identificar compuestos y/o determinar la concentración de estos en una solución. Esta técnica está basada en la absorción molecular y depende linealmente de la concentración del compuesto que se esté analizando en la muestra [14] [32].

3.3.1 Irradiancia espectral

La irradiancia, I , se define como la potencia, o flujo, radiante incidente de un haz de luz por unidad de área [15], se expresa como:

$$I = \frac{d\Phi}{dA} \quad (1)$$

donde $d\Phi$ es la potencia radiante incidente (en Watts, W) y dA es el área sobre la que incide dicha potencia (m^2), siendo entonces las unidades de la irradiancia Wm^{-2} . Cuando la potencia radiante se distribuye de manera uniforme sobre toda una superficie, se usa la irradiancia promedio.

El espectrofotómetro UV-VIS es el instrumento usado para realizar espectroscopía. Antes de que la luz de las lámparas de este incida en una muestra debe pasar a través de un monocromador el cual aísla una longitud de onda de interés del haz, permitiendo que solo esta λ sea la que incida en la muestra. Por lo tanto, cuando se analiza la irradiancia en función de la longitud de onda, se habla de irradiancia espectral, I_λ , la cual tiene unidades $Wm^{-2}nm^{-1}$ [37] [38]. A continuación, presentamos dos ecuaciones para calcular la irradiancia espectral incidente de un espectrofotómetro que pasa a través de un monocromador, su uso depende de los datos que tengamos a disposición del espectrofotómetro. Los detalles de cómo se han obtenido las ecuaciones se presentan en el Apéndice A.

$$I_{\lambda_o} \approx \frac{1}{A} \frac{d\Phi}{d\lambda} \quad (2)$$

La ecuación (2) deberá emplearse cuando conozcamos el flujo radiante espectral incidente en función de la longitud de onda de interés, $\Phi_\lambda = \frac{d\Phi}{d\lambda}$, y el área sobre la que se incide, A . Esta ecuación es la definición estándar de irradiancia espectral en espectroscopía.

Por otro lado,

$$I_\lambda \approx \frac{\Phi S_\lambda T_\lambda}{A \Delta\lambda} \quad (3)$$

deberá usarse cuando conozcamos el flujo radiante total de la fuente, Φ , la distribución espectral de la fuente, S_λ , la transmitancia del monocromador, T_λ , el área sobre la que se incide, A , y la anchura de banda espectral del monocromador para la longitud de onda

deseada, $\Delta\lambda$.

3.3.2 Transmitancia espectral

La transmitancia, T , es la fracción de luz que atraviesa perpendicularmente en un medio, sin ser absorbida ni esparcida, en relación con la cantidad inicial de la radiación incidente [39]:

$$T = \frac{I}{I_o} \quad (4)$$

donde I_o es la irradiancia inicial sobre el medio e I es la irradiancia final que emerge de él. El rango de T es de 0 a 1; también se puede expresar en porcentaje de transmitancia, multiplicando $100T$.

Siguiendo en el contexto de espectroscopía, la transmitancia también puede describirse en función de las longitudes de onda [40], por lo que ahora se hablaría de una transmitancia espectral, T_λ , descrita por la siguiente en términos de la irradiancia espectral:

$$T_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_{\lambda_o}} \quad (5)$$

3.3.3 Absorbancia y espectro de absorción

La absorbancia, A , es la medida cuantitativa de la capacidad de una muestra para absorber la luz que lo atraviesa. Si se imagina que la muestra es dividida en capas iguales, cada una absorbe un porcentaje constante de la luz, por lo tanto, la absorción es de carácter acumulativo conforme la luz atraviesa cada porción de la muestra sucesivamente. Entonces, de esto se puede razonar que la transmitancia decrece de manera exponencial [40] [41]:

$$A = -\log T \quad (6)$$

con $0 < T < 1$. De esta ecuación podemos deducir que cuando la luz no es absorbida ($I_o = I$), $A = 0$. Si el 90% de la irradiancia es absorbida, entonces $A = 1$. Cuando el 1% de la irradiancia es transmitida, $A = 2$ [40].

También se puede medir la cantidad de luz absorbida por una muestra en una longitud de onda específica [40], obteniendo la Absorbancia espectral:

$$A_{\lambda} = -\log T_{\lambda} \quad (7)$$

Los átomos y las moléculas poseen niveles de energía discretos que son únicos para cada especie. Cuando una muestra absorbe radiación electromagnética, solo lo hace en aquellas frecuencias específicas que le permiten transitar a un estado de mayor energía o excitado. Estas frecuencias de absorción características se pueden representar gráficamente mediante un espectro de absorción, el cual muestra cómo varía la absorbancia de la muestra en función de la longitud de onda de la radiación incidente [31].

La apariencia de estos espectros permite clasificarlos en tres tipos principales. Los espectros de línea constan de picos nítidos y bien definidos, originados por especies monoatómicas que absorben longitudes de onda muy específicas. [31].

Por otro lado, los espectros de banda presentan grupos de líneas tan cercanos entre sí que se observan como picos anchos. Este espectro es característico de las moléculas, ya que cada nivel electrónico molecular posee múltiples subniveles de energía vibracional y rotacional. La enorme cantidad de transiciones posibles entre estos estados da como resultado la absorción en un intervalo continuo de longitudes de onda. Aunque la forma de la banda se debe a estas transiciones vibracionales y rotacionales, el interés de este trabajo se centra en la transición electrónica principal, que es la que se origina con la radiación de la región UV-Visible. En moléculas orgánicas, estas transiciones corresponden típicamente a promociones electrónicas de tipo $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ [31] [39] [42].

Finalmente, se pueden presentar espectros continuos, los cuales no presentan picos sino una curva suave y continua. Este tipo de espectros se visualizan en muestras en estado condensado y con moléculas disolventes [31].

La absorbancia es adimensional, pero en las gráficas se colocarán u.a (unidades de absorbancia) como su unidad de medida.

3.3.4 Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer-Lambert, establece una relación lineal entre la concentración y absorbancia de una sustancia [43] expresada en la siguiente ecuación [14]:

$$A_{\lambda} = \alpha_{\lambda}cl \quad (8)$$

donde, α_{λ} es la absortividad o coeficiente de absorción ($cm^2/células$), c la concentración celular ($células/cm^3$) y l la longitud del camino óptico de la celda del espectrofotómetro (cm). El coeficiente de absorción es característico del compuesto que se esté analizando y depende de la λ . Este coeficiente y la concentración también pueden ser expresados en términos de molaridad, pero para propósitos de la tesis se han convertido para su uso con número de células. La deducción de la ecuación de la ley de Beer-Lambert es desarrollada en el Apéndice B.

Para aplicar la ley de Beer-Lambert se deben cumplir las siguientes condiciones [27]:

1. Concentración: Solo es aplicable a soluciones disueltas. Para valores altos de concentración, la distancia entre las partículas absorbentes es tan pequeña que se altera la capacidad de absorción de la muestra.
2. Radiación monocromática: La luz incidente del equipo debe ser monocromática, puesto que la ley está definida para estas radiaciones.
3. Sin reacciones químicas: La solución no debe presentar reacciones químicas entre el compuesto a analizar y el disolvente.

3.4 Microalgas verdes: *Chlorella sp.*

Las algas son organismos fotosintéticos talófitos que habitan diversos ambientes acuáticos y terrestres del mundo. El término *alga* puede referirse a macroalga o microalga, siendo el primero pluricelular y el segundo unicelular. Las algas no son monofiléticas (no comparten un ancestro en común), por ello, se han clasificado en cuatro reinos con sus respectivas divisiones: el reino Bacteria se encuentra en el dominio Bacteria, y los reinos Plantae, Chromista y Protista en el Eukarya. El reino Bacteria tiene a la Cyanobacteria como único filo. Los filos del reino Plantae son Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta y Charophyta. Para el reino Chromista, sus filos son Haptophyta, Cryptophyta, Ochrophyta y Cercozoa. En el reino Protista, sus divisiones son Myxozoa y Euglenozoa [44] [45] [46].

Las algas verdes, Chlorophyta, son muy parecidas a las plantas por poseer como color un verde pasto brillante y el 90% de las especies habitan aguas dulces [46] [45]. La *Chlorella sp.* es un género de algas verdes unicelulares perteneciente a este filo que se encuentran ampliamente en hábitats acuáticos de agua dulce.

3.4.1 Descripción general

Chlorella sp. es una microalga no motil (no flagelada), siendo una célula con morfología esférica a elipsoidal y tamaño de aprox. 2-12 μm . Al ser una célula eucariota, presenta membrana plasmática y una pared celular externa, esta última puede estar compuesta por polisacáridos (incluida celulosa, entre otros componentes), proporcionando rigidez y protección. En el citoplasma se encuentra el núcleo (con nucleolo) y otros organelos. Además, posee un cloroplasto parietal, frecuentemente cupuliforme, y en muchas especies se observa un pirenoide, estructura asociada al metabolismo del carbono y a la fijación de CO_2 . La figura 7 muestra una ilustración de su estructura celular [45] [46] [47].

La reproducción puede ser asexual mediante la formación de autosporas que se liberan al romper la pared de la célula madre, permitiendo un crecimiento poblacional rápido

o asexual mediante la formación de gametos que se fusionan mediante fecundación [46] [48].

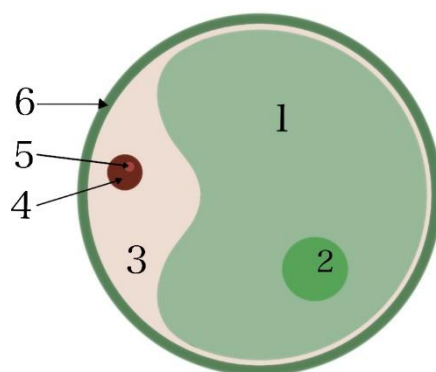


Figura 7: Esquema de la estructura celular de la microalga verde *Chlorella sp.* 1) Cloroplasto. 2) Pirenoide. 3) Citoplasma. 4) Núcleo. 5) Nucleolo. 6) Membrana plasmática y pared celular.

Para un óptimo cultivo en un medio líquido, deben mantenerse idealmente a la temperatura ambiente del lugar donde fue recolectada la muestra. La mayoría de las especies toleran temperaturas de entre 16-27 °C, pero se recomienda 18 – 20 °C. Adicionalmente, si la temperatura del medio es menor a 16 °C causa un crecimiento lento de las microalgas, y una temperatura superior a 35 °C es letal. [44]

La luz que se use para proporcionar energía a las microalgas debe tener una irradiancia mínima suficiente para llevar a cabo la fotosíntesis de $42 \mu \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (irradiancia en unidades de radiación fotosintéticamente activa) a 15 °C, en un rango de 400 -750 nm [49].

3.4.2 Pigmentos fotosintéticos

Todos los organismos fotosintéticos contienen moléculas orgánicas llamadas pigmentos fotosintéticos, cuya función es capturar la radiación electromagnética y transformarla en energía química, se encuentran en el cloroplasto de las algas. Cada pigmento absorbe longitudes de onda específicas de la luz visible, que en conjunto forman su espectro de absorción. Las longitudes de onda no absorbidas son reflejadas [49] [50].

Los dos grupos de pigmentos más importantes que contienen las algas son las clorofilas y los carotenoides. La clorofila es la principal responsable de la absorción de luz y tiene cinco tipos principales: a, b, c₁, c₂, d. Los carotenoides, además de absorber luz, sirven como disipador del exceso de energía absorbida en forma de calor. Los carotenoides se clasifican en carotenos y xantofilas, ambos compuestos de hidrocarburos y solo los segundos son carotenoides con oxígeno. De todos los pigmentos, el más importante es la clorofila a, pues es la única que, además de absorber la luz, la transforma en energía química. Al resto de pigmentos se les conoce como pigmentos accesorios [50] [51] [52].

Todas las algas Chlorophyta tienen clorofila a y b, las cuales sintetizan almidón en conjunto con el cloroplasto y pirenoide para su almacenamiento. Además, contienen carotenoides tales como β -caroteno y xantofilas. La clorofila a tiene dos bandas de absorción en 400 - 450 nm (azul) y 650 - 700 nm (rojo). La clorofila b tiene bandas de absorción en 450 - 500 nm (azul) y 600 - 650 nm (rojo). Los carotenoides presentan picos en la banda de absorción 400 - 500 (azul) [44] [45] [46] [53].

3.5 Absorbancia como indicador de la atenuación de la luz

Anteriormente se ha manifestado que la alta turbidez en el ecosistema el pez amarillo representa un grave problema para su desarrollo, siendo su caracterización el motivo principal del presente trabajo de investigación, sin embargo, no se reportará la turbidez en el sentido normativo, sino que se ha optado por emplear la absorbancia espectral UV-VIS como un indicador alternativo para cuantificar la atenuación de la luz en un medio acuático producida por las microalgas. La atenuación se refiere a la disminución de la cantidad de radiación conforme la luz atraviesa un medio debido a su absorción y dispersión [54]. Esta elección responde a una combinación de factores que se detallan a continuación:

Fundamento físico:

La absorbancia espectral, ecuación (7), representa una medida logarítmica de cuanta

radiación es absorbida por una muestra a una longitud de onda específica. Esta relación, entre la irradiancia espectral inicial y final, se deriva de la ley de Beer–Lambert, ecuación (8), la cual asume que la atenuación de luz es exponencial y proporcional a la concentración de las partículas absorbentes, la longitud de la celda y la absortividad. De esta manera, la absorbancia se convierte en un indicador de la atenuación de la irradiancia cuando la pérdida de radiación se debe predominantemente a fenómenos de absorción.

Características ópticas de la muestra:

La microalga *Chlorella sp.*, utilizada como suspensión en este estudio, tiene un tamaño de 2-12 μm , es decir, es mayor que las longitudes de onda de interés, lo que implica la presencia de dispersión de Mie. Aunque la absorbancia medida por el espectrofotómetro incluye tanto la absorción real de los pigmentos como la atenuación por dispersión, esta última se manifiesta principalmente como una baseline o fondo espectral continuo.

Por lo tanto, en este trabajo se asume que la atenuación total medida es la suma de la absorción y la dispersión. Dado que la dispersión varía suavemente con la longitud de onda y no presenta picos agudos en la región visible, su contribución puede ser identificada y corregida matemáticamente en el análisis de resultados, permitiendo aislar la absorbancia debida exclusivamente a los pigmentos fotosintéticos.

Limitaciones instrumentales:

El espectrofotómetro utilizado, VE-5100UV de *Velab*, no proporciona una lectura directa de la irradiancia espectral, sino que reporta absorbancia a partir de una medición relativa respecto a una referencia. Esto implica que, sin el uso de sensores calibrados, no es posible conocer con exactitud el valor de la irradiancia incidente en la muestra.

El Apéndice A desarrolla métodos indirectos para calcular la irradiancia espectral del espectrofotómetro usando propiedades de las lámparas y el monocromador

conociendo sus valores. En el caso del instrumento utilizado en este trabajo, el proveedor no pudo calcular/medir algunas de las propiedades requeridas.

Aplicación de la absorbancia a modelos de irradiancia en profundidad:

Usando el espectro de absorbancia es posible extrapolar la atenuación de la irradiancia espectral en función de la profundidad óptica, z , dentro del medio utilizando una forma extendida de la ley de Beer-Lambert.

$$I_{\lambda} = I_{\lambda_o} 10^{-A_{\lambda} \frac{z}{l}} \quad (9)$$

Esta ecuación establece que la atenuación de la luz sigue una relación exponencial con la distancia recorrida por la luz y la concentración del medio. Por lo tanto, nos permite modelar de forma relativa cómo se comporta la irradiancia transmitida sin necesidad de conocer el valor absoluto de la irradiancia espectral inicial. Entonces, usando la siguiente ecuación podremos describir que fracción de la irradiancia inicial espectral se transmite a mayores profundidades:

$$\frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}} = 10^{-A_{\lambda} \frac{z}{l}} \quad (10)$$

Esta ecuación podría referirse a la transmitancia espectral, pero para propósitos de esta tesis, al reportar los resultados nos referiremos a ella como irradiancia espectral relativa. El Apéndice C contiene la obtención detallada de la ecuación (9) y (10).

4 Marco experimental

4.1 Consideraciones generales del diseño experimental

El diseño experimental del presente trabajo se centró en establecer condiciones controladas para analizar la interacción entre la radiación electromagnética (en la región UV-VIS) y una suspensión de microalgas verdes, con el objetivo de estudiar la atenuación de la irradiancia en función de la concentración celular y la profundidad óptica.

Se optó por implementar un sistema de cultivo tipo batch, ampliamente utilizado en estudios de microalgas debido a su simplicidad operativa, facilidad de control y capacidad para mantener condiciones experimentales cerradas sin flujo continuo de nutrientes [49]. En este sistema, los cultivos fueron alojados en matraces cerrados por tapones de hule, dentro de los cuales se insertaron mangueras conectadas a una bomba de aire, con la longitud suficiente para suministrar aireación desde el fondo del matraz. De este modo, se permitió una mezcla continua del medio y una buena transferencia de dióxido de carbono, esencial para la fotosíntesis y el crecimiento de las microalgas. Los detalles del diseño experimental pueden ser consultados en el Apéndice D.1.

4.2 Estrategia de obtención y selección de la microalga

La microalga utilizada fue obtenida de una muestra de agua recolectada del estaque del Laboratorio de Ecofisiología Animal, el cual alberga al Mexclapique de Lerma. La elección de este entorno estuvo orientada en conocer y caracterizar los componentes que influyen en la atenuación de la irradiancia en el hábitat natural de esta especie, provocando la disminución de su población.

La muestra ambiental obtenida contenía una cantidad mixta de microorganismos, dentro de la cual se observó una especie de microalga que predominaba visiblemente en densidad. Se estableció entonces un proceso de selección de cepas a través de subcultivos secuenciales, aplicando observación microscópica para reducir

progresivamente la diversidad y favorecer la prevalencia de la microalga dominante, consulte el Apéndice D.2 para conocer el proceso. Este procedimiento permitió obtener un sistema de cultivo, aunque no axénico, puede definirse como un cuasi monocultivo, es decir, un cultivo que presenta homogeneidad morfológica visible y estabilidad poblacional, dominado por una única cepa con características compatibles con *Chlorella sp.*

4.3 Selección y justificación del medio de cultivo

El Medio Basal de Bold fue elegido por su uso para cultivo de microalgas verdes como la *Chlorella sp.*, el cual ofrece un balance adecuado de nutrientes por su composición definida, facilitando a reproducción de condiciones experimentales. Además, al ser un medio mineral no tiene un espectro de absorción característico como los pigmentos fotosintéticos, de tal modo que no genera interferencias significativas en el rango UV-VIS durante la espectroscopía. La preparación detallada del medio se encuentra en el Apéndice D.3.

4.4 Consideraciones para el mantenimiento y estabilidad del cultivo

Una vez establecido el cuasi monocultivo, se mantuvo en condiciones constantes de iluminación y temperatura para asegurar su estabilidad fisiológica durante la fase de crecimiento. El cultivo se mantuvo en el área de Calorimetría del Laboratorio de Nanotermodinámica y Sistemas Complejos, siendo ésta una zona sin ventanas y exposición directa al sol, lo cual permitió una temperatura e iluminación constante, utilizando como fuente una Luz LED marca Enbrighten de 13.31W (modelo 52352). El cultivo fue monitoreado visualmente y mediante observaciones periódicas al microscopio para verificar la ausencia de contaminantes y la estabilidad morfológica.

El sistema batch se implementó de forma discontinua secuencial, es decir, sin adición de nutrientes durante el crecimiento. Una vez que el cultivo alcanzaba la fase de muerte

celular, se seleccionaba uno de los matraces como cultivo madre. A partir de este, se tomaba una muestra para inocular nuevos matraces con medio fresco, reiniciando así el ciclo. Consulte el Apéndice D.4 para conocer los detalles del mantenimiento del cultivo.

4.5 Preparación para la fase de medición óptica

Con el fin de mantener la reproducción de la caracterización espectral, se determinó un protocolo de preparación basado en dilución de la muestra a analizar en la etapa exponencial. Este procedimiento se implementó con el objetivo de controlar la concentración de las muestras, manteniéndolas dentro de un rango adecuado de absorbancia y evitando efectos significativos de dispersión. Además, se estableció un tiempo estándar para la recolección de la muestra a analizar. Vea el Apéndice D.5 para conocer el protocolo.

5 Resultados y análisis

5.1 Parámetros físico-ambientales del experimento

El monitoreo ambiental se realizó con un Arduino MKR WiFi 1010 + MKR IoT Carrier, registrando temperatura (°C), humedad relativa (%), presión atmosférica (hPa) e iluminancia (lux) a intervalos de 10 minutos desde el día 0 de inoculación (11 de octubre de 2024) hasta el día 3 en la fase de crecimiento y de las mediciones espectroscópicas (14 de octubre de 2024). Los datos se registraron en tiempo real con fecha y hora en una hoja de cálculo mediante el programa PLX-DAQ. El procedimiento y el código del sistema de monitoreo se documentaron previamente en el Apéndice E, por lo que en esta sección se reportan únicamente los resultados y su relevancia física para la interpretación de las medidas ópticas.

La iluminancia es el parámetro más crítico para un cultivo fototrófico como el de la *Chlorella sp.* La fuente de luz principal del sistema fue un sistema de iluminación LED, manteniéndose apagada la luz general del laboratorio para evitar interferencias. Durante los cuatro días, la iluminancia se mantuvo a un nivel estable (70 – 90 lx), con pequeñas oscilaciones de pocos lux entre puntos consecutivos, vea Fig. 8. Estas fluctuaciones de baja amplitud son consistentes con variaciones de voltaje de la red eléctrica del edificio. Esta estabilidad muestra que el flujo de fotones disponible para la fotosíntesis fue homogéneo a lo largo del tiempo, permitiendo un crecimiento consistente. Se observa un evento atípico el 11 de octubre entre las 22:00 y 23:30, con picos mayores a 600 lx, atribuible al encendido de la iluminación del laboratorio por posibles labores de limpieza. Dado que fue un evento puntual, de corta duración y ocurrido durante la fase inicial de adaptación del cultivo, se considera que no tuvo un impacto significativo en el desarrollo general mismo ni en los resultados espectroscópicos finales.

La temperatura y humedad relativa son factores que pueden influir directamente en la tasa de crecimiento y el metabolismo de la microalga. Como se muestra en la Fig. 9, la temperatura ambiente se mantuvo en un rango estrecho y controlado, oscilando

principalmente entre 23.8 °C y 24.7 °C. Se observa un ligero ciclo diario, con temperaturas mínimas registradas durante las horas de la madrugada y un pico gradual hacia el mediodía, lo cual es congruente con la inercia térmica de un espacio interior. Al tener una estabilidad térmica, con una variación total aproximada a 1 °C durante todo el experimento, permite considerar al sistema como cuasi-estacionario, y por lo tanto atribuir las variaciones espectrales como debidas principalmente a cambios de concentración/pigmentos y no propiedades termodependientes, además se asegura que el cultivo no fue sometido a estrés térmico que pudiera alterar su fisiología.

Por su parte, la humedad relativa del ambiente, Fig. 10, se mantuvo en un rango medio-bajo, entre 40% y 45%, durante la mayor parte del periodo experimental, con un descenso transitorio la madrugada del 12 de octubre y una ligera recuperación posterior. El 11 de octubre aparece un repunte al final, que podría asociarse al mismo intervalo de limpieza (incremento de humedad ambiental). La ausencia de fluctuaciones drásticas en la humedad indica un ambiente controlado, lo cual minimiza las variaciones en la tasa de evaporación del medio de cultivo.

La presión atmosférica fue monitoreada como un indicador de la estabilidad de las condiciones ambientales generales. En la Fig. 11 se observa un comportamiento cíclico diario, característico de mareas atmosféricas, con dos máximos y dos mínimos a lo largo de un periodo de 24 horas. Los valores registrados oscilaron entre 749 y 754 hPa. Es importante contextualizar estos datos, el laboratorio se ubica en Toluca, México, una ciudad a una altitud aproximada de 2,660 metros sobre el nivel del mar. La presión atmosférica estándar a dicha altitud es de aproximadamente 747 hPa. Por lo tanto, los valores medidos son consistentes con la ubicación geográfica del experimento y sus variaciones diarias corresponden a fenómenos naturales esperados.

En conjunto, la caracterización de los parámetros físico-ambientales confirma que el cultivo de *Chlorella sp.* se desarrolló en un entorno altamente estable y controlado. Esta validación es fundamental para atribuir los resultados del análisis espectroscópico a las propiedades ópticas intrínsecas de la microalga y su interacción con el medio de cultivo.

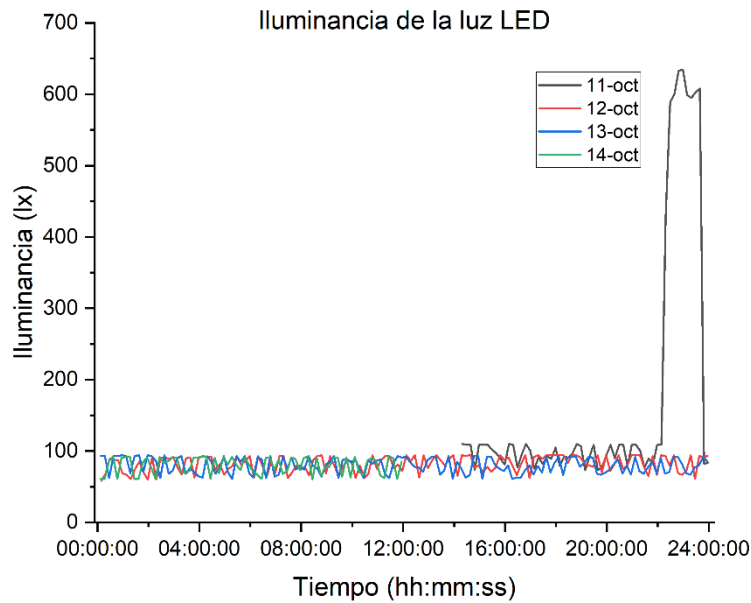


Figura 8: Registro de la iluminancia en el área del cultivo. La gráfica muestra una iluminancia (lx) en función del tiempo, monitoreada del 11 al 14 de octubre de 2024. Se observa una base estable proveniente de la luz LED, con un valor promedio de 93.3 lux. El pico atípico superior a 600 lux registrado el 11 de octubre corresponde al encendido de la luz general del laboratorio por actividades de limpieza.

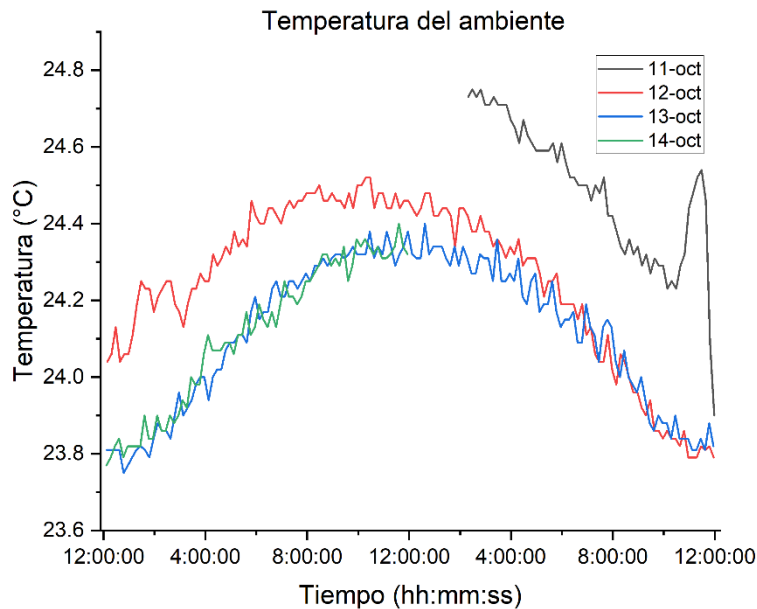


Figura 9: Variación de la temperatura ambiental durante el experimento. Se representa la temperatura (°C) en función del tiempo para los días 11 al 14 de octubre de 2024. Los datos muestran un comportamiento cíclico diario y una alta estabilidad, manteniéndose dentro de un rango estrecho de 23.8 °C a 24.7 °C.

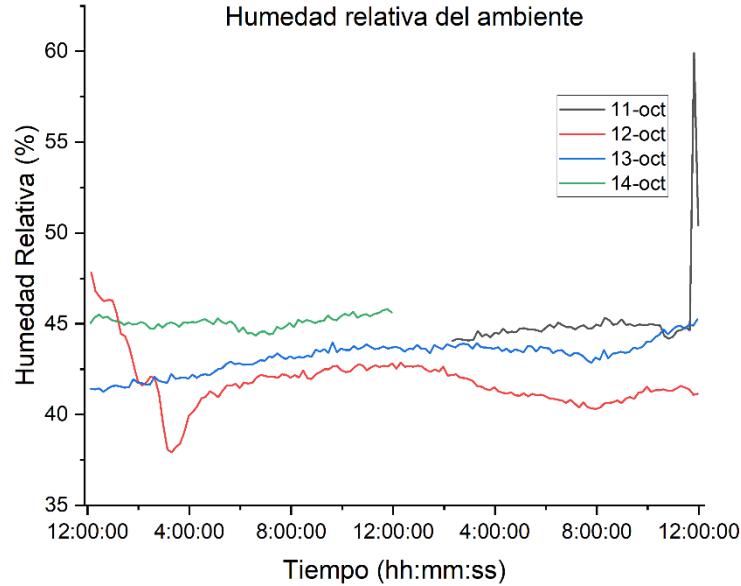


Figura 10: Seguimiento de la humedad relativa ambiental. La gráfica muestra el porcentaje de humedad relativa en función del tiempo, registrado del 11 al 14 de octubre de 2024. Los valores se mantuvieron estables en un rango entre 40% y 50%, lo que indica un ambiente controlado que minimiza las variaciones en la tasa de evaporación del medio de cultivo.

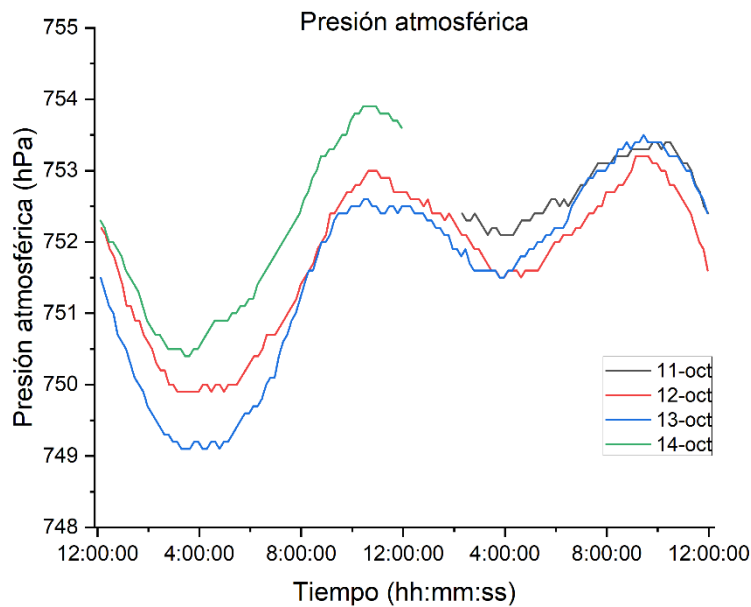


Figura 11: Monitoreo de la presión atmosférica ambiental. La gráfica ilustra la variación de la presión (hPa) del 11 al 14 de octubre de 2024. Se observa un patrón cíclico, característico de las mareas atmosféricas. Los valores se mantuvieron estables en un rango de 640 a 654 hPa, consistentes con la altitud del sitio experimental en Toluca, México.

5.2 Caracterización morfológica de las muestras

La caracterización morfológica del cuasi monocultivo, obtenido a partir del protocolo de aislamiento detallado en el Apéndice D, se realizó mediante microscopía óptica. El objetivo principal fue confirmar la identidad de la especie predominante y evaluar la composición general de la muestra utilizada en los análisis espectroscópicos.

Las observaciones a un aumento de 100x, Fig. 12, revelaron una población de células de morfología predominante esférica a ligeramente elipsoidal, lo cual es característico del género *Chlorella sp.*. Dentro de las células, fue posible distinguir algunas de las estructuras subcelulares clave para su identificación. Se observó un cloroplasto único, grande en forma de copa que ocupaba una porción significativa del citoplasma. En algunas células también se pudo identificar la presencia de un pirenoide dentro del cloroplasto, así como la región correspondiente al núcleo. Estas características morfológicas son consistentes con la descripción taxonómica de *Chlorella sp.*

Con el objetivo de cuantificar el tamaño celular, se obtuvo una imagen con un aumento de 20x y se procesó con un software de análisis de imagen, Fig. 13. Los resultados indicaron que la mayoría de la población celular presentaba un diámetro que se encontraba en el límite inferior del rango reportado para el género, con tamaños predominantes de 2 a 4 μm . En términos ópticos, estos tamaños son comparables a las longitudes de onda de interés de este trabajo, y por lo tanto relevantes para la dispersión tipo Mie.

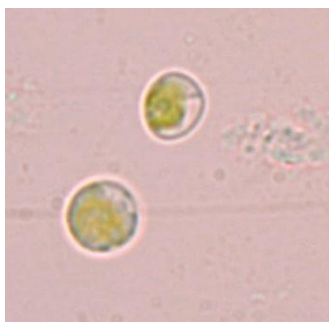


Figura 12: Morfología diagnóstica de *Chlorella sp.*, predominante en el cuasi monocultivo. Micrografía con aumento de 100x. Se distingue un cloroplasto en forma de copa con pirenoide y el núcleo por transparencia.

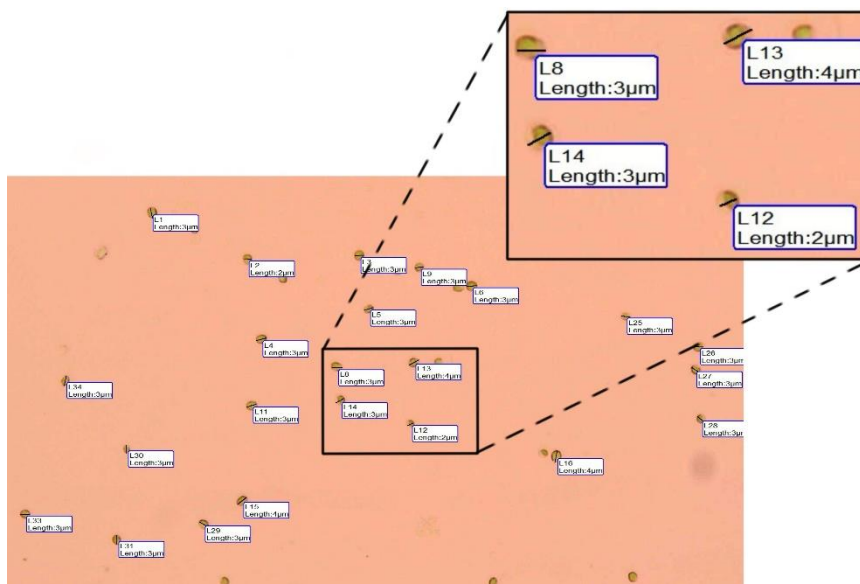


Figura 13: Análisis del diámetro celular de *Chlorella sp.*. Micrografía (aumento 20x) con anotaciones de mediciones obtenidas mediante software, la mayoría de las células presenta diámetros 2-4 µm, dentro del rango típico reportado para *Chlorella sp.*.

Durante el seguimiento del cultivo, desde la fase de aislamiento hasta las mediciones espectroscópicas del 14 de octubre, se detectó la presencia constante de un segundo organismo eucariota y móvil que coexistía con la microalga. La observación de la muestra final en la cámara de Neubauer, Fig. 14, permitió identificar a este organismo como una especie del género *Euglena*, caracterizada por su forma fusiforme y su motilidad. La presencia de *Euglena sp.* fue considerada y su concentración fue contabilizada por separado para tenerla en cuenta como una posible interferencia o contribución adicional en los resultados espectroscópicos del cuasi monocultivo, ya que al ser un organismo fotosintético cuenta con pigmentos como clorofilas a/b y carotenoides [55].

Adicionalmente, se notó la formación de estructuras mucilaginosas y agregados celulares en el cultivo, visibles en observaciones microscópicas, Fig. 15. Esta es una característica conocida de *Chlorella sp.*, que en ciertas fases de su crecimiento o bajo condiciones de estrés produce y secreta sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés). Estas estructuras macromoleculares están compuestas principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los EPS de *Chlorella sp.* son

polisacáridos compuestos principalmente por hexosas y ácidos úricos. El mucílago cumple funciones biológicas importantes para la microalga, como la protección contra factores adversos, la adhesión a superficies y la formación de agregados (flóculos). La presencia de este mucílago en el sistema es esperable y relevante, ya que a altas densidades puede aumentar la distribución angular de la luz dispersada [55] [56].

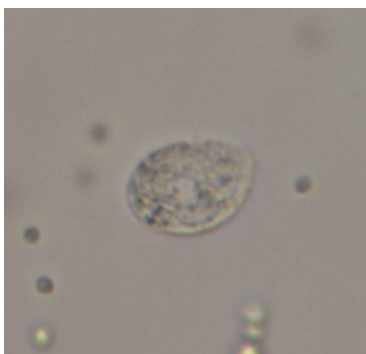


Figura 14: Presencia de *Euglena sp.* en la muestra del 14 de octubre. Micrografía (aumento 40x) de la suspensión celular final. Se aprecia un organismo móvil de morfología fusiforme, identificado como *Euglena sp.*, coexistiendo con células de *Chlorella sp.*

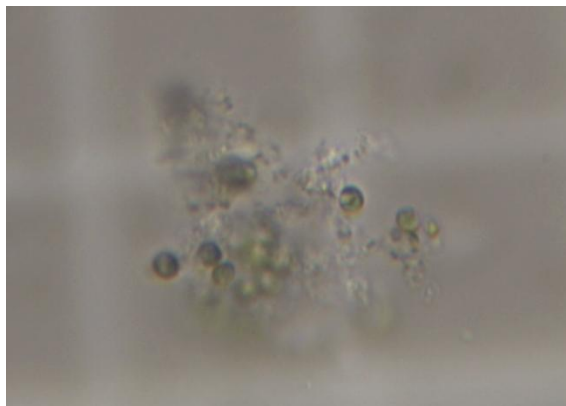


Figura 15: Formación de mucílago durante la obtención del del cuasi monocultivo. Micrografía (aumento 40x) donde se aprecian células de *Chlorella sp.* unidas a una formación mucilaginosa. Esta agregación es atribuida a la producción de exopolisacáridos (EPS) por parte de la microalga.

5.3 Determinación de la concentración celular

La concentración celular del cultivo de *Chlorella sp.*, en la fecha de los análisis espectroscópicos (14 de octubre), se determinó mediante el conteo directo de tres alícuotas independientes tomadas del matraz de cultivo, utilizando una cámara de

Neubauer mejorada. El resultado de este procedimiento arrojó una concentración celular promedio de $29,450,000 \frac{cel}{mL}$. Esta medición sirvió como base para establecer la densidad poblacional de las cuatro muestras preparadas para el análisis espectroscópico, cuyo protocolo de preparación y manejo se detalla en el Apéndice D.5.

La concentración de la Muestra 1, compuesta íntegramente por el cultivo sin diluir (4 mL), corresponde directamente a la concentración promedio medida. Las concentraciones de las muestras subsecuentes se calcularon en función de las diluciones realizadas con agua desionizada. Las concentraciones celulares para cada una de las cuatro muestras analizadas fueron las siguientes:

- Muestra 1 (4 mL del cultivo): $29,450,000 \frac{cel}{mL}$.
- Muestra 2 (3 mL del cultivo + 1 mL de agua desionizada): $22,087,500 \frac{cel}{mL}$.
- Muestra 3 (2 mL del cultivo + 2 mL de agua desionizada): $14,725,000 \frac{cel}{mL}$.
- Muestra 4 (1 mL del cultivo + 3 mL de agua desionizada): $7,362,500 \frac{cel}{mL}$.

Paralelamente al conteo de *Chlorella sp.*, se realizó la cuantificación del organismo coexistente, *Euglena sp.*, en las mismas alícuotas del matraz, obteniendo una concentración promedio de $3,333 \frac{cel}{mL}$. Para evaluar la relevancia de esta población secundaria en los resultados espectroscópicos, se determinó su contribución porcentual total de células. La población de *Euglena sp.* representa únicamente el 0.0113% del total de las células cuantificadas. Este valor es estadísticamente insignificante y se encuentra muy por debajo del margen de error experimental inherente al método de conteo en cámara, el cual depende del tipo de muestra, típicamente <10%. Adicionalmente, la presencia de agregados mucilaginosos el día de los espectros fue escasa y de tamaño pequeño.

Por consiguiente, para los cálculos y análisis espectroscópicos posteriores, se asumió que la contribución de las propiedades ópticas por parte de la población de *Euglena sp.*

y el efecto de dispersión de la luz por el mucílago eran despreciables. De este modo, se atribuyeron las propiedades ópticas observadas exclusivamente a la población de *Chlorella sp.* en las concentraciones especificadas.

5.4 Espectros de absorción del sistema experimental

En esta sección se presentan los resultados del análisis espectrofotométrico realizado el 14 de octubre. El objetivo fue caracterizar las propiedades de absorción óptica del cultivo de *Chlorella sp.* y de los componentes en su entorno (el medio de cultivo y agua desionizada) en el rango de longitudes de onda de 300 a 800 nm. Si bien las mediciones originales cubrieron 200 – 800 nm, se excluyó la región del UV < 300 nm al observar un ascenso abrupto de la absorbancia en los tres materiales, atribuible principalmente a la baja energía de la lámpara del espectrofotómetro, la luz parasita y un incremento de dispersión, comprometiendo la fiabilidad de los datos.

5.4.1 Espectros de controles: Agua desionizada y Medio de cultivo

Antes de analizar la muestra biológica, se caracterizaron los componentes abióticos del sistema para establecer una línea base y asegurar que no presentaran interferencias en la región de interés.

El espectro de absorción del agua desionizada (AD), medido utilizando aire como referencia, se presenta en la Fig. 16. Se observa que el agua es prácticamente transparente en todo el rango visible (400 – 700 nm), con valores de absorbancia cercanos a cero. Esto confirma que el agua, utilizada como solvente principal y para las diluciones, no contribuye significativamente a la absorción de la luz del sistema.

Posteriormente, se midió el espectro del medio de cultivo estéril, Basal de Bold (BBM), utilizando el agua desionizada como línea base, vea Fig. 17. El espectro resultante es igualmente plano y cercano a cero en la región visible. Esta medición demuestra que los nutrientes y sales disueltos en el medio de cultivo tampoco poseen cromóforos que

absorban la luz en el rango de operación de los pigmentos fotosintéticos

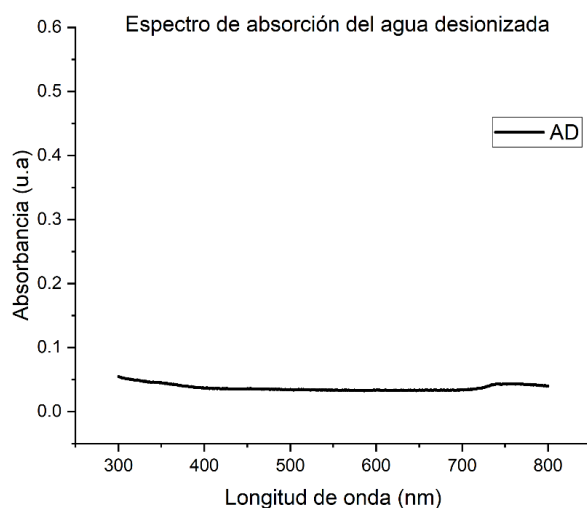


Figura 16: Espectro de absorción del agua desionizada en celda de cuarzo de 1cm, en el rango de 300 a 800 nm, utilizando aire como baseline. La absorbancia es prácticamente nula en toda la región, confirmando su transparencia y validándola como un solvente sin interferencias ópticas.

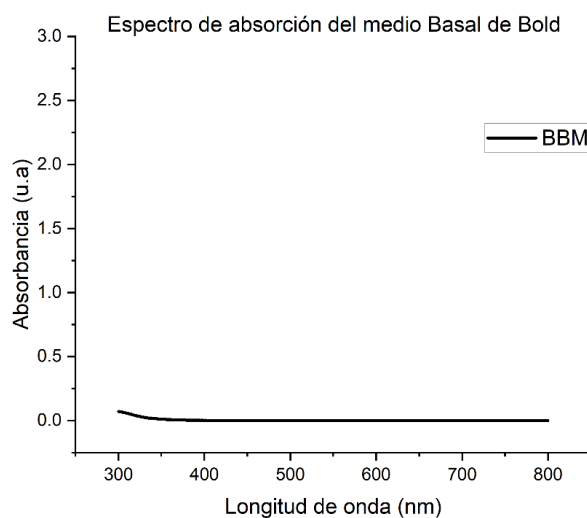


Figura 17: Espectro de absorción del medio Basal de Bold (BBM), registrado con baseline de agua desionizada. Se observa una señal cercana a cero en el rango 300-800 nm, lo que indica que el medio no introduce interferencias significativas en esta región.

La combinación de ambos espectros de control valida que cualquier pico de absorción significativo observado en las muestras de microalgas es atribuible exclusivamente a la presencia de las células de *Chlorella sp.*

5.4.2 Espectro de absorción de *Chlorella sp.* in vivo

En la Fig. 18 se muestran los espectros de absorción de las cuatro muestras de *Chlorella sp.* a diferentes concentraciones celulares. Los espectros obtenidos son un ejemplo de espectros de banda. A diferencia de los espectros de línea, asociados a transiciones atómicas discretas, un espectro de banda es característico de moléculas complejas. La enorme cantidad de transiciones posibles entre estados en una molécula, cada una con una energía ligeramente diferente, provoca que los picos de absorción se ensanchen, fusionándose en bandas continuas.

Se observa que la magnitud de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración celular, en concordancia con la ley de Beer-Lambert en cuanto a linealidad. Para la identificación precisa de los picos, se utilizó como referencia el espectro de la muestra de mayor concentración (4 mL de cultivo), ya que presenta mejor relación señal-ruido.

El análisis del espectro revela la presencia de varios picos y hombros de absorción, los cuales son la “huella dactilar” de los pigmentos fotosintéticos presentes en las células de *Chlorella sp.* [45] [46]. Hablando desde una perspectiva física, la absorción de un fotón por estas moléculas induce transiciones electrónicas moleculares, principalmente de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Esto ocurre porque pigmentos como las clorofilas y los carotenoides poseen extensos sistemas de electrones deslocalizados en enlaces dobles conjugados, es decir, la secuencia de enlaces dobles y simples alternados hace que las regiones de probabilidad de los electrones π de cada enlace doble se fusionen en una única región continua resultando en electrones compartidos a lo largo de varios átomos a la vez en lugar de estar atrapados entre solo dos. La energía de un fotón absorbido excita a un electrón desde un orbital molecular π a un orbital molecular π^* de mayor energía [23] [31] [54] [57] [58].

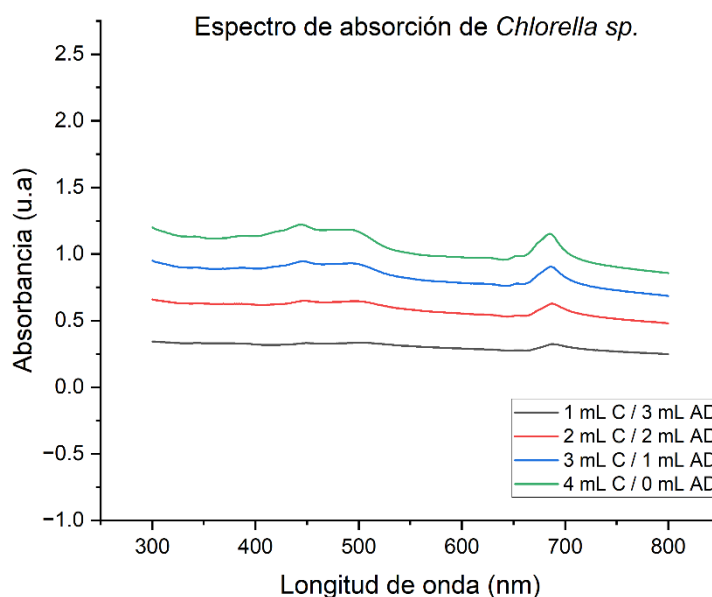


Figura 18: Espectros de absorción de *Chlorella sp.* registrados *in vivo* en cuatro concentraciones distintas (muestras 1-4). Se aprecian bandas características en la región azul (445 nm) y roja (685 nm), asociadas a clorofila a, así como picos secundarios en 655 y 490 nm atribuibles a clorofila b y carotenoides. Las diferencias de absorbancia entre las curvas reflejan la variación de concentración celular.

Las posiciones de los picos observados *in vivo* (célula viva) presentan un ensanchamiento de banda en comparación con los picos de los pigmentos puros medidos en un solvente [44] [45] [54] [59]. La razón de este desplazamiento se debe a que, dentro del cloroplasto, los pigmentos no están libres, sino que se encuentran anclados a complejos de proteínas dentro de las membranas tilacoidales [44] [45]. Esta matriz de proteína que rodea cada pigmento actúa como un entorno dieléctrico inmediato, el cual tiene una constante dieléctrica y campos eléctricos locales muy diferentes a los de un solvente homogéneo. Este entorno interactúa con el sistema de electrones π del pigmento, modificando la diferencia de energía entre los estados electrónicos fundamental y excitado (las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$). Como resultado, la energía exacta del fotón necesaria para la transición electrónica disminuye, lo que se traduce en la absorción de luz a longitudes de onda mayores [54] [58] [60].

El perfil espectral de la muestra se caracteriza por la presencia de distintas bandas de

absorción en la región visible y UV-A. La región de absorción más intensa se encuentra en la zona azul-violeta del espectro. Esta área, dominada por un pico prominente a 445 nm y un hombro ancho a 490 nm, es conocida técnicamente como la banda de Soret. Esta banda corresponde a la transición electrónica de mayor energía de los pigmentos, es decir, surge de la transición de electrones del estado fundamental al segundo estado excitado, la cual es de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. El pico principal a 445 nm corresponde a la clorofila a, mientras que el hombro a 490 nm es una superposición de la banda de Soret de la clorofila b y la absorción de los carotenoides [54] [58].

En la región roja del espectro, se observa una segunda zona de absorción importante, aunque menos intensa. Estos picos, un máximo a 685 nm y un hombro a 655 nm, son conocidos como las bandas Qy. Corresponden a la transición electrónica de menor energía, es decir, surge de la transición de electrones del estado fundamental al primer estado excitado, que es también de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. El pico a 685 nm es atribuible a la clorofila a, mientras que el hombro a 655 nm es característico de la clorofila b [54] [58].

Finalmente, en la región UV-A se observa una banda ancha y poco estructurada (340 nm a 390 nm). Se le atribuye a la cola de la banda de Soret y a la superposición con la absorción débil de la matriz celular y a la dispersión que crece al disminuir la longitud de onda. Dado que se aprecia un continuo sin picos nítidos, esta parte se tratarán como fondo espectral [61].

En conjunto, el espectro de absorción confirma la identidad del cultivo como un alga verde con un perfil de pigmentos sano y característico, proporcionando la base para el posterior análisis de la atenuación de la luz.

5.5 Curvas de calibración: relación entre la absorbancia y la concentración

En este apartado se establece el modelo matemático que relaciona la concentración

celular de *Chlorella sp.* con la absorbancia medida. El propósito es validar la aplicabilidad de la Ley de Beer-Lambert al sistema experimental y obtener una herramienta cuantitativa para determinar la densidad poblacional de muestras desconocida de forma espectroscópica. Para ello, se utilizaron las cuatro muestras de concentración conocida, detalladas en la sección 5.3.

Se seleccionaron dos longitudes de onda de trabajo basadas en los picos de absorción característicos de la clorofila a, identificados en los espectros de la sección 5.4.2: 445 nm, correspondiente al máximo de la banda de Soret, y 685 nm, correspondiente al máximo de la banda Qy. La elección de estas longitudes de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{m\acute{a}x}$) son las más sensibles para monitorear cambios en la biomasa y minimiza los errores instrumentales, ya que pequeños incrementos de densidad celular producen variaciones detectables en absorbancia.

5.5.1 Calibración con datos espectrales directos

Inicialmente, se graficó la absorbancia medida directamente por el espectrofotómetro en función de la concentración celular. En las Fig. 19 y Fig.20 se presentan las curvas de calibración para 445 nm y 685 nm, respectivamente.

Ambos ajustes lineales muestran una excelente correlación, con coeficientes de determinación (R^2) de 0.99896 para 445 nm y 0.99812 para 685 nm. Estos valores, muy cercanos a 1, confirman la fuerte relación lineal entre la absorbancia y la concentración de células en el rango de las concentraciones evaluadas. La pendiente de la recta a 445 nm (4.03341×10^{-8}) es ligeramente mayor que a 685 nm (3.7729×10^{-8}), lo que refleja la mayor absorptividad de la banda de Soret y, por ende, una mayor sensibilidad del método en la región azul del espectro.

Sin embargo, un análisis detallado en las ordenadas de origen revela un resultado físicamente inconsistente. Los valores de la ordenada de origen son de 0.0434 para 445 nm y 0.0546 para 685 nm. Teóricamente, a una concentración que tiende a cero células, la absorbancia debería tender a cero. Estos altos valores positivos son un artefacto

experimental atribuible a la dispersión de la luz, ruido electrónico y/o diferencias en la referencia usada en la baseline.

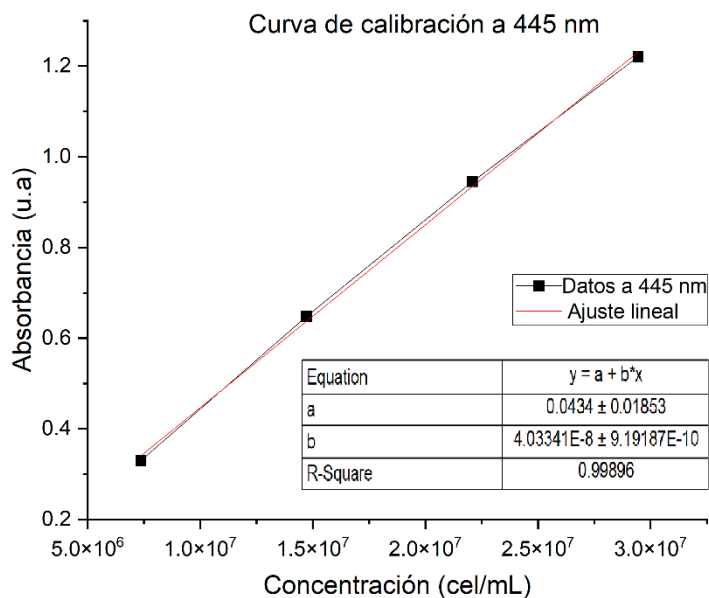


Figura 19: Curva de calibración a 445 nm utilizando los datos de absorbancia directos. Se observa una linealidad de $R^2=0.99896$ El intercepto no nulo sugiere la presencia de un fondo espectral.

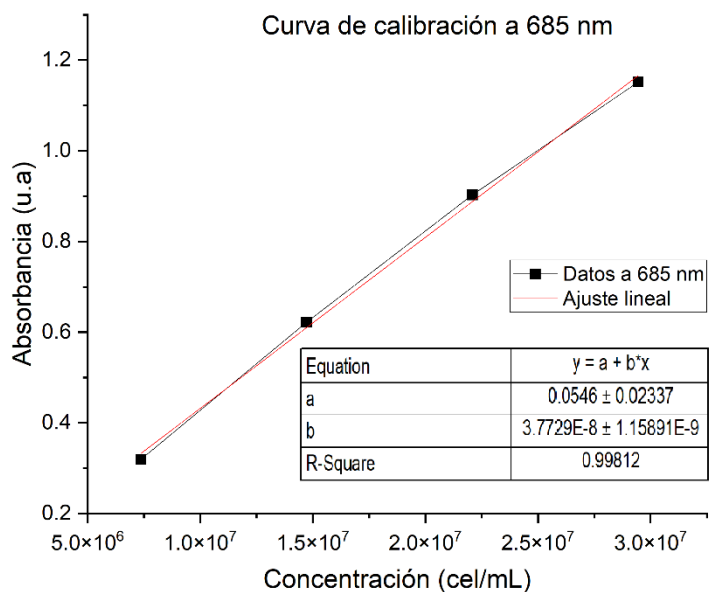


Figura 20: Curva de calibración a 685 nm utilizando datos de absorbancia directos. Presenta linealidad elevada ($R^2=0.99812$) y fondo espectral distinto a cero.

5.5.2 Corrección de la dispersión y calibración mejorada

Para aislar la absorbancia real debida a los pigmentos y eliminar el fondo de espectral, se aplicó un método de corrección estándar. Se asumió que a 750 nm la absorción de los pigmentos es despreciable, por lo que cualquier señal medida a esa longitud de onda se debe casi exclusivamente a la dispersión o imperfecciones instrumentales [62]. Esta señal se restó de los valores de absorbancia medidos en los picos de interés.

$$A_{\lambda_{\text{corregida}}} = A_{\lambda_{\text{máx}}} - A_{750 \text{ nm}} \quad (11)$$

Las Fig. 21 y Fig. 22 muestran las curvas de calibración utilizando la absorbancia corregida. La linealidad se mantiene, con valores de R^2 de 0.99499 y 0.99715, respectivamente. La mejora más significativa y fundamental se observa en la ordenada al origen, que se redujeron a -0.0301 para 445 nm y -0.0189 para 685 nm. Estos nuevos valores son estadísticamente cercanos a cero, lo que dota al modelo con coherencia física.

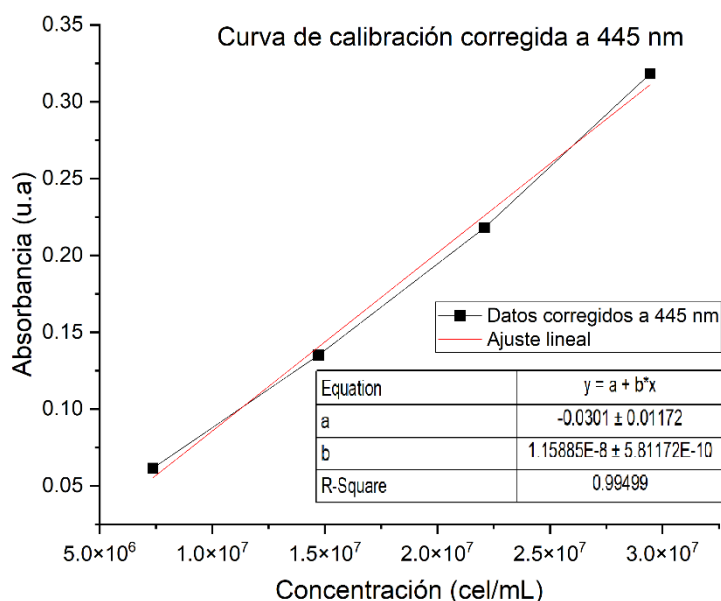


Figura 21: Curva de calibración a 445 nm utilizando absorbancia corregida. El intercepto se aproxima a cero, manteniendo linealidad elevada ($R^2 = 0.99499$).

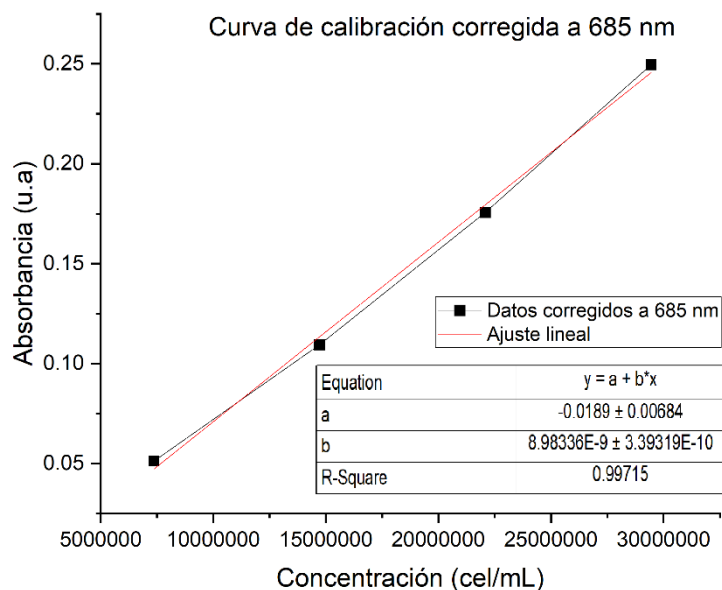


Figura 22: Curva de calibración corregida a 685 nm. La corrección reduce el offset, con $R^2 = 0.99715$, validando la proporcionalidad absorbancia-concentración.

La corrección valida que la dispersión, aunque no dominante, es un factor medible que debe ser considerado para una cuantificación precisa. Las ecuaciones de ajuste obtenidas de estas curvas corregidas representan un modelo más exacto. Por lo tanto, serán estas las ecuaciones que se deberán emplear si se desea determinar la concentración celular en análisis futuros.

5.6 Cálculo del coeficiente espectral de absorción

Una vez validada la linealidad entre la absorbancia y la concentración celular en la sección 5.5, fue posible determinar el coeficiente de absorción por célula, α_λ , físicamente interpretado como la sección eficaz de absorción.

Dimensionalmente, este coeficiente es expresado en unidades de área por célula ($cm^2 cel^{-1}$) y representa el área efectiva con la que una célula intercepta y absorbe fotones a una longitud de onda dada.

5.6.1 Metodología del cálculo

Para obtener el espectro de α_λ en todo el rango de interés (300 nm – 800 nm), se procesaron los espectros de absorbancia corregida de las cuatro muestras utilizando el programa descrito en el Apéndice F. El cálculo se realizó aplicando la siguiente relación derivada de la ley de Beer-Lambert:

$$\alpha_\lambda = \frac{A_{\lambda \text{ corregida}}}{c l} \quad (12)$$

donde $A_{\lambda \text{ corregida}}$ es la absorbancia espectral corregida, c es la concentración celular de la muestra convirtiendo el volumen a cm^3 (cel cm^{-3}) y l es la longitud de camino óptico de la celda (1 cm).

5.6.2 Análisis del espectro de coeficiente de absorción

La Fig. 23 presenta los espectros de sección eficaz calculados para las cuatro concentraciones. Se observa que el perfil espectral es consistente en todas las muestras, reproduciendo las bandas características identificadas previamente: la banda de Soret (~ 445 nm) y la banda Qy (~ 685 nm).

Al analizar la superposición de las curvas, se destacan tres fenómenos físicos:

1. Estabilidad en la propiedad intrínseca: Los valores de α_λ son aproximadamente constantes entre diluciones (del orden de $10^{-9} \text{cm}^2 \text{cel}^{-1}$ sin tendencia sistémica con la concentración), lo cual es consistente interpretarlo como una propiedad intrínseca de la célula en el rango de concentraciones estudiado.
2. Ausencia de efecto sombra: Si existiera un apantallamiento relevante entre células, es decir, un efecto sombra donde unas células reducen la irradiancia incidente sobre otras, se esperaría que el coeficiente espectral de absorción por célula disminuyera sistemáticamente al aumentar la concentración como consecuencia de una menor irradiancia efectiva disponible por partícula. Sin embargo, los datos experimentales no muestran dicha tendencia. Se observa que los coeficientes de absorción se mantienen aproximadamente constantes, con

una ligera tendencia a valores mayores en la muestra con mayor concentración, particularmente en la regiones espectrales asociadas a máximos de absorción pigmentaria. Esto indica que, en el rango de concentraciones analizado, el efecto sombra no domina en la atenuación observada. Es posible que, dados los resultados, se deba a la contribución de dispersión múltiple a altas densidades, celulares la cual puede incrementar ligeramente el camino óptico del medio y, por ende, la absorción aparente, sin violar la linealidad del modelo.

3. Relación señal-ruido: En la región del infrarrojo cercano (>750 nm) y en el ultravioleta (<350 nm) se observa que la muestra de mayor concentración (Muestra 1, línea negra) presenta una señal más estable y con menor dispersión. En contraste, la muestra más diluida (línea violeta) exhibe mayores fluctuaciones, incluyendo valores ligeramente negativos hacia longitudes de onda cercanas a 800 nm. Estos valores no poseen significado físico y se interpretan como el resultado de restar la baseline a una señal que se encuentra cercana al límite de detección del instrumento.

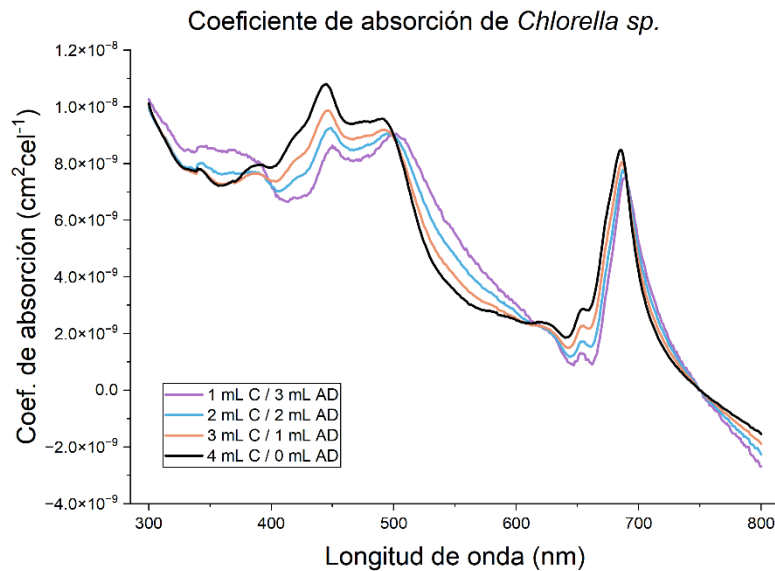


Figura 23: Espectros del coeficiente de absorción (α_λ) calculados para cuatro concentraciones distintas de *Chlorella sp.*. Las curvas muestran la sección eficaz de absorción por célula. La consistencia entre curvas valida la ausencia de efectos de sombra significativos. La divergencia observada a longitudes de onda mayores a 750 nm se debe al ruido instrumental asociado a la corrección de la baseline en muestras de baja concentración.

A partir de este análisis espectral y confirmar la estabilidad de la propiedad intrínseca, se procedió a determinar valores cuantitativos representativos de la sección eficaz de absorción para las bandas de interés biológico promediando los valores de las cuatro muestras.

Tabla 1: Valores calculados del coeficiente de absorción α_λ para los máximos espectrales de *Chlorella sp.*. Estos datos representan el promedio de las cuatro concentraciones evaluadas. La desviación estándar refleja la variabilidad experimental asociada a las mediciones espectrofotométricas y al procesamiento de datos.

Longitud de onda (nm)	Asignación del Pico	Promedio α_λ ($10^{-9} \text{cm}^2 \text{cel}^{-1}$)	Desviación estándar ($10^{-9} \text{cm}^2 \text{cel}^{-1}$)	Interpretación física
340	Región UV-A	8.0525	0.362	Alta atenuación UV (Protección)
390	Cola banda Soret	7.8327	0.2032	Transición UV-VIS
445	Banda Soret (Clorofila a)	9.5508	1.0425	Máxima captura de energía (azul)
490	Clorofila b/Carotenoides	9.0998	0.3791	Absorción de pigmentos accesoros
655	Banda Qy (Clorofila b)	2.0433	0.6878	Hombro de absorción rojo
685	Banda Qy (Clorofila a)	7.7022	0.6564	Pico principal de fotosíntesis (Rojo)

La Tabla 1 resume los valores del coeficiente espectral de absorción en longitudes de onda representativas. Se incluye las bandas fotosintéticas clásicas asociadas a la clorofila, así como los valores correspondientes a la región UV-A (340 y 390 nm). Aunque esta región no presenta de picos espectrales agudos, los coeficientes de absorción obtenidos muestran una sección eficaz elevada y relativamente estable ($\sim 8.0 \times 10^{-9} \text{cm}^2$), comparable en orden de magnitud a la observada en los máximos de absorción de la clorofila. Desde un punto de vista físico, este resultado indica que la *Chlorella sp.* posee una capacidad intrínseca significativa para atenuar radiación ultravioleta mediante absorción, lo cual sugiere que, en condiciones ambientales reales, poblaciones microalgales podrían contribuir de manera relevante a la reducción de la irradiancia UV incidente en los cuerpos de agua, aspecto de interés para la protección del hábitat del pez Mexclapique.

5.7 Análisis de atenuación espectral de la luz

El coeficiente de absorción determinado en la sección anterior caracteriza a la célula individual. Sin embargo, para comprender el impacto ecológico en el hábitat del Mexclapique, es necesario escalar este comportamiento al nivel macroscópico. En esta sección se analiza cómo se extingue la señal luminosa conforme penetra en una columna de agua, considerando el efecto colectivo de microalgas.

La atenuación espectral de la luz en suspensiones de *Chlorella sp.* se analizó a partir de la irradiancia espectral relativa, definida como la fracción de la irradiancia incidente que se transmite a una profundidad z dentro del medio. Para modelar la distribución de la luz en función de la profundidad, se utilizó la ecuación de atenuación exponencial derivada en el Apéndice C (Ec. 10), aplicada a los valores de absorbancia espectral corregidos y considerando un camino óptico unitario de referencia.

5.7.1 Evolución de la irradiancia espectral con la profundidad

La Fig. 24 muestra la irradiancia espectral relativa en función de la longitud de onda para la muestra de mayor concentración (Muestra 1), evaluada a profundidades entre 1 y 5 cm. Se observa que la irradiancia relativa decrece de manera continua al aumentar la profundidad, mostrando una atenuación exponencial consistente con el modelo teórico.

El análisis de las curvas evidencia una extinción selectiva, mediante la cual la composición espectral de la radiación se modifica progresivamente con la profundidad:

1. Agotamiento rápido de la radiación fotosintéticamente activa: En las bandas azul (445 nm) y roja (685 nm), asociadas a los máximos de absorción de la clorofila *a*, la irradiancia relativa disminuye de forma muy pronunciada. A una profundidad de 5 cm (línea violeta), la irradiancia disponible en el máximo azul es inferior al 3%, lo que indica que las capas superficiales absorben casi completamente estos fotones de alta energía.
2. Ventana de transmisión en la región verde: El intervalo espectral entre 577 y

492 nm, donde la sección eficaz de absorción de los pigmentos fotosintéticos es mínima, la atenuación es considerablemente menor. Como consecuencia, esta banda del espectro visible presenta la mayor capacidad de penetración y contribuye de forma dominante a la radiación emergente desde capas más profundas, lo que explica el predominante color verde en medios acuáticos turbios.

3. Atenuación eficiente en la región UV-A: En la región ultravioleta cercana (300-400 nm), relevante para la percepción visual del pez, se observa un decaimiento acumulado significativo de la irradiancia, aun en ausencia de picos espectrales bien definidos. A 5 cm de profundidad, menos del 7% de la irradiancia UV incidente se mantiene, lo que evidencia una elevada capacidad del medio para atenuar radiación de alta frecuencia.

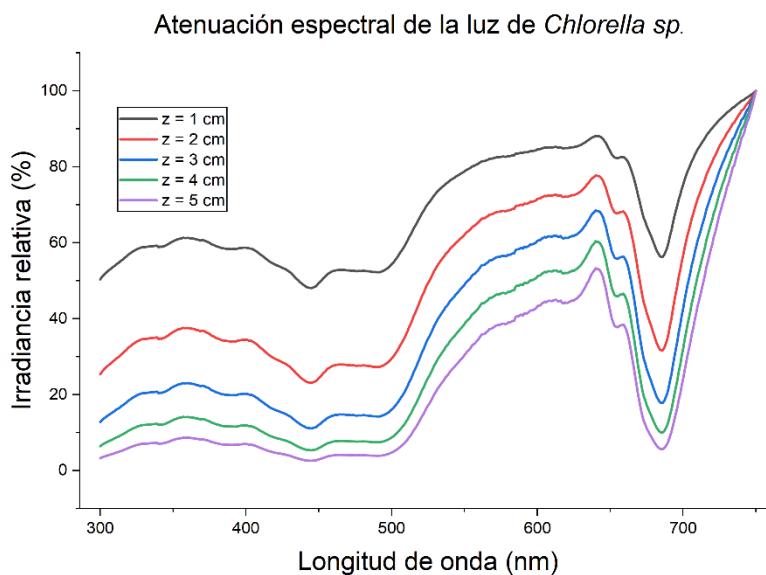


Figura 24: Evolución de la atenuación espectral de la luz en un cultivo de *Chlorella sp.* (concentración de 2.945×10^7 cel mL^{-1}) a diferentes profundidades (z = 1 a 5 cm).

En conjunto, estos resultados muestran que el efecto sombra identificado en este análisis corresponde a un fenómeno macroscópico y acumulativo, asociado a la atenuación progresiva de la irradiancia conforme la radiación atraviesa sucesivas capas

del medio. Este efecto no debe confundirse con el posible apantallamiento microscópico entre células individuales analizado en la sección 5.6, el cual fue descartado a partir de la independencia del coeficiente espectral de absorción respecto a la concentración.

5.7.2 Profundidad crítica de visión

Desde una perspectiva biofísica, no basta con saber que la luz disminuye, es necesario determinar la distancia límite a la cual la señal visual se vuelve imperceptible o insuficiente. Se define la profundidad crítica, $z_{10\%}$, como la distancia a la cual la irradiancia espectral se reduce al 10% de su valor superficie. El Apéndice C detalla la obtención de esta profundidad crítica.

La Tabla 2 presenta los valores calculados de $z_{10\%}$ para las distintas bandas espectrales, basados en la concentración de la Muestra 1 (2.945×10^7 cel mL⁻¹)

Tabla 2: Profundidad crítica estimada para distintas bandas espectrales en la suspensión de *Chlorella sp.* a la cual la irradiancia se reduce al 10% del valor superficial en un escenario alta densidad microalgal.

Longitud de onda (nm)	Banda espectral	Profundidad crítica $z_{10\%}$ (cm)
340	UV-A	4.3
390	UV/Violeta	4.3
445	Azul	3.1
490	Azul-verde	3.5
550	Verde	9.7
655	Rojo	11.8
685	Rojo	4.0

Los resultados indican que, en condiciones de alta concentración microalgal, el horizonte óptico efectivo en la región UV-A es del orden de 4.3 cm. Desde el punto de vista físico, esta profundidad crítica representa la distancia a partir de la cual la irradiancia ultravioleta disponible se reduce por debajo del 10% de su valor superficial.

Considerando que estudios previos han reportado que la coloración y señalización visual del Mexclapique dependen tanto de la región ultravioleta como la visible, y que la sensibilidad espectral de la retina de los peces teleósteos presenta un máximo cercano a 360 nm, estos resultados sugieren que la detección de patrones visuales UV podría verse fuertemente limitada en medios altamente turbios. En este contexto, para que la hembra perciba señales UV reflejadas por un macho, ambos individuos tendrían que encontrarse a distancias muy cortas entre sí o próximos a la superficie, donde la irradiancia disponible es mayor

Adicionalmente, la marcada diferencia entre las profundidades críticas asociadas al hombro rojo (655 nm) y al máximo principal de absorción (685 nm), siendo la primera casi tres veces mayor, evidencia como variaciones relativamente pequeñas en la longitud de onda dentro de la misma región espectral pueden traducirse en cambios significativos en la disponibilidad de la luz del medio acuático. Este resultado muestra que el comportamiento óptico depende fuertemente de la longitud de onda de la radiación incidente, lo que hace necesario un análisis espectral de la atenuación de la luz.

6 Conclusiones

El presente trabajo logró caracterizar de manera cuantitativa el acoplamiento entre la concentración celular y la atenuación espectral de la luz en cultivos de *Chlorella sp.*, estableciendo un marco biofísico sólido para analizar el impacto de la turbidez biológica en sistemas acuáticos. A partir de mediciones espectrofotométricas *in vivo*, análisis espectral y modelado físico, se obtienen las siguientes conclusiones principales:

1. Validación del modelo físico de atenuación

Se demostró que, en el rango de concentraciones estudiadas, la atenuación de la luz ocasionada por *Chlorella sp.* sigue un comportamiento compatible con la Ley de Beer-Lambert, con coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.99$). Esto valida el uso de la absorbancia espectral como un estimador físico confiable de la densidad celular y permite modelar la propagación de la luz mediante relaciones exponenciales. A nivel microscópico, no se observaron evidencias de un apantallamiento significativo que rompiera la linealidad del modelo.

2. Determinación de una propiedad óptica intrínseca

Se calculó la sección eficaz de la absorción espectral (α_λ) de *Chlorella sp.*, obteniéndose valores del orden de $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ cel}^{-1}$, relativamente estables entre las distintas concentraciones evaluadas. Esta estabilidad indica que α_λ puede interpretarse como una propiedad intrínseca del sistema luz-célula, lo que la convierte en un parámetro físico robusto para describir la interacción radiación-materia y modelar la atenuación de la luz en escenarios de distinta densidad algal, superando las limitaciones de métricas globales como las unidades nefelométricas.

3. Filtrado espectral selectivo del medio

Los espectros de absorción muestran que *Chlorella sp.* actúa como un filtro óptico selectivo del espectro electromagnético. Se observa una absorción intensa en las bandas azul ($\sim 445 \text{ nm}$) y roja ($\sim 685 \text{ nm}$), asociadas a transiciones

electrónicas moleculares de la clorofila, mientras que en la región verde (~500-600 nm) presenta una menor atenuación relativa. Este comportamiento explica físicamente la mayor penetración de estas longitudes de onda y el color característico de cuerpos de agua eutrofizados.

4. Atenuación eficiente en la región ultravioleta

A pesar de no presentar picos espectrales agudos, la región UV-A (300-400 nm) mostró coeficientes de absorción comparables en magnitud a los máximos fotosintéticos. Este resultado evidencia que *Chlorella sp.* posee una capacidad intrínseca elevada para atenuar radiación ultravioleta, lo que convierte a la turbidez biológica en un mecanismo altamente eficiente de bloque selectivo en esta región.

5. Impacto colectivo y reducción del horizonte óptico

El modelado de la irradiancia espectral relativa en función de la profundidad reveló que, si bien a nivel individual no se detecta efecto de apantallamiento dominante, a escala macroscópica la acumulación de células genera una atenuación severa y progresiva de la radiación. En condiciones de alta densidad algal (2.945×10^7 cel mL⁻¹), la profundidad crítica ($z_{10\%}$) para la radiación UV-A se reduce a aproximadamente 4.3 cm, lo que implica una disminución drástica del horizonte óptico efectivo en este rango espectral.

6. Implicaciones biofísicas del entorno óptico

Desde una perspectiva física, estos resultados muestran que la turbidez biológica no solo reduce la intensidad luminosa, sino que transforma cualitativamente la composición espectral de la radiación disponible. La extinción selectiva de longitudes de onda clave sugiere que procesos biológicos dependientes de señales visuales, particularmente en el ultravioleta y el visible cercano, pueden verse comprometidos en medios eutrofizados, al limitar severamente la propagación de dichas señales a escalas espaciales muy reducidas.

En conjunto, este estudio demuestra que la absorbancia espectral UV-VIS, analizada en función de la longitud de onda, constituye una herramienta física adecuada para cuantificar la atenuación de la luz en medios acuáticos dominados por microalgas. El enfoque adoptado permite vincular propiedades ópticas fundamentales con consecuencias ecológicas observables, proporcionando una base cuantitativa para evaluar el impacto de la eutrofización sobre la disponibilidad de la luz y la funcionalidad visual de organismos acuáticos.

7 Glosario biológico

Aplanosporas: Son esporas no flageladas que comienzan su desarrollo dentro de la pared celular de la madre y tienen su propia pared.

Autosporas: Aplanosporas que tienen la misma forma de la célula madre y son liberadas al romper la pared celular de la madre. Se forman en múltiplos de dos [44] [45] [46].

Citoplasma: Coloide que se encarga de albergar a los organelos y está compuesto por agua (< 50%), proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, sales minerales, entre otros [63].

Cloroplasto: Organelo rodeado por doble membrana que contiene los pigmentos fotosintéticos. Algunas veces contiene el pirenoide [45].

Componente abiótico: Componentes no vivos que forman parte de un ecosistema [64].

Cromóforo: Parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color [65].

Cultivo axénico: Cultivo de una sola especie no contaminado ni asociado con otros organismos vivos [66].

División: Sinónimo de Filo el cual se suele usar para el reino Plantae.

Dominio: Primer nivel de la clasificación taxonómica el cual divide a los seres vivos de acuerdo con su genética y estructura celular. Los grupos son Eubacterya, Archea y Eukarya [67].

Especie: Es la unidad básica en la clasificación taxonómica, la cual considera organismos con similitudes genéticas, morfológicas y reproductivas [68].

Espora: Células que se producen por reproducción asexual que permiten la propagación y supervivencia de la especie [44].

Filo: Tercer nivel de la clasificación taxonómica el cual agrupa a los organismos que comparten rasgos básicos de organización corporal o estructural [69].

Flagelo: Estructura delgada recubierta por la membrana celular que da la capacidad de movimiento libre a las células [63].

Fotótrofo: Organismo que obtiene su energía de la luz solar [70].

Hidrato de carbono: Moléculas compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno, llamados también azúcares [71].

Hidrocarburo: Compuestos orgánicos que contienen principalmente de carbono e hidrógeno [72].

Inóculo: Es el material o sustancia que se introduce o se utiliza para la inoculación, que puede ser la introducción de microorganismos, virus o células en un organismo o en un medio de cultivo [73].

Monofilético: Grupo de organismos que descienden del mismo ancestro [74].

Núcleo: Organelo que contiene el material genético de la célula [75].

Nucleolo: Organelo dentro del núcleo que elabora ribosomas. Se compone de ARN y proteínas [76].

Pirenoide: Organelo fundamentalmente proteico, que se puede encontrar dentro del cloroplasto, que funciona como reservorio de RuBisCo, enzima que fija el dióxido de carbono [45].

Polisacáridos: Hidrato de carbono formado por una cadena larga de monosacáridos [71].

Reino: Segundo nivel de la clasificación taxonómica el cual agrupa a los organismos que comparten características fundamentales en su organización celular, tipología celular, mecanismos de nutrición, reproducción, respiración y locomoción [77].

Sintetizar: Producir o construir una sustancia compleja a partir de componentes más simples [78].

Talo: El cuerpo de un alga, el cual no está diferenciado en tallo, las hojas y raíces debido a la ausencia de tejido vascular [46] [63].

Talófito: Organismos fotosintéticos que carecen de raíces, tallo y hojas, pero presentan talo [45].

8 Apéndices

Apéndice A: Deducción de ecuaciones para la Irradiancia espectral incidente generada por un espectrofotómetro con Monocromador

Este apéndice presenta la deducción de dos ecuaciones para calcular la irradiancia espectral incidente generada por un espectrofotómetro UV-VIS equipado con un monocromador. La elección entre ambas expresiones depende de los datos disponibles en el sistema óptico. La primera ecuación parte del flujo radiante espectral, mientras que la segunda se basa en la potencia total de la lámpara, su distribución espectral y la transmitancia del monocromador.

A.1 Conceptos previos

Antes de proceder con la deducción de las ecuaciones que permitirán calcular la irradiancia espectral incidente generada por un espectrofotómetro con monocromador, es necesario definir los conceptos involucrados. Los términos abordados a continuación serán utilizados tanto para la deducción de la primera ecuación, que parte del flujo radiante espectral incidente, como en la deducción de la segunda, basada en parámetros de caracterización del sistema como la distribución espectral y la transmitancia del monocromador.

Flujo radiante (Φ):

El flujo, o potencia, radiante Φ se refiere a la cantidad total de energía electromagnética emitida, transferida o recibida por unidad de tiempo, medida en watts (W). El flujo radiante espectral, Φ_λ , toma en cuenta las características espectrales de la potencia, por lo tanto, se define como la cantidad total de energía por unidad de tiempo y unidad de longitud de onda, expresado en Wnm^{-1} [31] [54] [79] [80]:

$$\Phi_\lambda = \frac{d\Phi}{d\lambda} \quad (a.1)$$

Irradiancia espectral (I_λ):

La irradiancia espectral I_λ es el flujo radiante recibido por unidad de área y unidad longitud de onda, es decir, representa cuanta energía electromagnética a una longitud de onda específica llega a un elemento infinitesimal de área. Sus unidades: $Wm^{-2}nm^{-1}$ [54].

Distribución espectral de la fuente (S_λ):

Cualquier objeto que emite radiación electromagnética tiene una distribución de longitudes de onda de su radiación, es decir, a ciertas longitudes de onda se emitirá más radiación que en otras [17] [80].

La emitancia espectral es la potencia por unidad de área radiante. Esta función representa la distribución de longitudes de onda de la radiación, la cual depende de la longitud de onda y la temperatura de la fuente, con unidades $W m^{-2} nm^{-1}$ cuando se habla de emitancia espectral. Además, no existe una única ecuación para la distribución, ya que depende de la naturaleza física de la fuente de luz.

La distribución de longitudes de onda se puede normalizar obteniendo la longitud de onda en la que la curva tiene su máximo y la emitancia espectral en ese máximo, con el objetivo de obtener una función adimensional cuyo valor máximo sea 1 y actúe como factor de ponderación para poder separar la potencia total de la distribución de longitudes de onda [80].

Lo anterior se le conoce como distribución espectral de potencia de la fuente, S_λ , cuya función describe como se distribuye la potencia de la lámpara entre las diferentes longitudes de onda, es decir, es la fracción de la potencia total que corresponde a la λ de interés [80].

Los espectrofotómetros UV-VIS usan típicamente dos lámparas para cubrir todo el rango de operación: una de deuterio para la región ultravioleta y una de tungsteno-halógeno para la región visible [40]. Las lámparas equipadas en el espectrofotómetro

utilizado en este trabajo fueron *Halogen Lamp 12V 20W* de *Miyakawa Corporation*, y *Deuterium lamp A510YXU-02*.

La lámpara de tungsteno es una fuente de radiación incandescente. Consiste en un filamento de tungsteno el cual se calienta por el paso de una corriente eléctrica a una temperatura muy alta (2870 – 3000 K) haciendo que brille. La distribución espectral de esta fuente se aproxima a la radiación de un cuerpo negro, por lo que podemos usar la Ley de Planck describir su distribución de longitudes de onda:

$$M_{\lambda,T} = \frac{2\pi hc^2}{\lambda} (e^{\frac{hc}{\lambda k_B T}} - 1)^{-1} \quad (a.2)$$

donde h es la constante de Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34} Js$), c la velocidad de la luz ($c = 3 \times 10^8 ms^{-2}$), k_B la constante de Boltzmann ($k_B = 1.38 \times 10^{-23} JK^{-1}$), λ la longitud de onda de interés, y T la temperatura de la superficie de la fuente en Kelvin [17] [31] [40].

Para normalizar la ley de Planck, es necesario encontrar la longitud de onda en la que la curva tiene su máximo a una temperatura de interés usando la ley de desplazamiento de Wien la cual describe que el pico de la distribución de longitud de onda se desplaza hacia frecuencias mayores conforme la temperatura aumenta [17] [80]:

$$\lambda_{max} = 2.898 \times 10^{-3} T^{-1} m \quad (a.3)$$

Después, se sustituye (a.3) en (a.2) para encontrar la emitancia espectral máxima en λ_{max} , $M_{\lambda,max}$. Con este resultado se puede normalizar (a.2) para encontrar la emitancia relativa a cierta λ , es decir la función de la distribución espectral de potencia. A su vez también se puede normalizar λ para obtener la longitud de onda relativa que no dependa de la temperatura. Entonces, usando las siguientes ecuaciones se obtiene la distribución espectral de potencia de un cuerpo negro, y a su vez para una lámpara de tungsteno.

$$S_{\lambda} = \frac{M_{\lambda}}{M_{\lambda, \max}} \quad (a.4)$$

$$\lambda_r = \frac{\lambda}{\lambda_{\max}} \quad (a.5)$$

La lámpara de deuterio funciona aplicando una descarga eléctrica a gas deuterio (D_2) a baja presión, causando que las moléculas salten a un estado electrónico excitado inestable. Al relajarse, la molécula se disocia formando dos átomos de deuterio, emitiendo durante el proceso fotones con longitudes de onda en el rango ultravioleta formando un espectro continuo en esa región debido a que la energía repartida entre las moléculas y fotón resultantes pueden variar. Debido a su funcionamiento, su distribución espectral de potencia no es tan simple como la de un cuerpo negro, por lo que su perfil se determina empíricamente mediante medición directa usando instrumental especializado [31].

Transmitancia espectral del monocromador (T_{λ}):

La transmitancia espectral de un monocromador, T_{λ} , es un factor adimensional que representa la eficiencia con la que el sistema óptico deja pasar la luz de una longitud de onda específica. Cada componente óptico absorbe o refleja una pequeña parte de la luz, resultando en pérdidas [31].

Ancho de banda espectral del monocromador ($\Delta\lambda$):

El ancho de banda, $\Delta\lambda$, medido en nm, es el pequeño intervalo de longitudes de onda que el monocromador realmente selecciona. Un monocromador no es perfecto, no aísla una única λ , sino una franja estrecha de longitudes de onda continua centrada en la de interés [31]. El ancho de banda del espectrofotómetro utilizado es de 2 nm.

Área de incidencia (A):

El área de incidencia es la sección transversal del haz de luz cuando llega a la celda con la muestra.

A.2 Ecuación A: Cálculo directo a partir del flujo radiante espectral

En esta sección se deduce una expresión para calcular la definición estándar de irradiancia espectral incidente a partir del flujo radiante espectral para una longitud de onda dada. Esta ecuación es útil cuando se cuenta con datos obtenidos por calibración del equipo o mediante sensores especializados.

A.1.1 Deducción matemática

Partimos del flujo radiante espectral, ecuación (a.1), que representa la densidad de potencia por unidad de longitud de onda que sale del monocromador. Sin embargo, este no produce un ancho de banda $d\lambda$ infinitesimal, si no una banda finita $\Delta\lambda$. Entonces, para obtener la potencia real que emerge a través de la rendija de salida del monocromador, se multiplica la densidad de flujo por el ancho de banda:

$$\Phi_{\Delta\lambda} \approx \frac{d\Phi}{d\lambda} \Delta\lambda \quad (a.6)$$

La ecuación (a.6) es una aproximación válida para un $\Delta\lambda$ pequeño donde se asume que $\frac{d\Phi}{d\lambda}$ es constante.

La irradiancia promedio sobre la banda $\Delta\lambda$ se obtiene al dividir la potencia (a.6) por el área de incidencia A :

$$I_{\Delta\lambda} \approx \frac{\Phi_{\Delta\lambda}}{A} \quad (a.7)$$

Finalmente, para obtener la irradiancia espectral, que es una densidad (potencia por área y por longitud de onda), se divide la irradiancia (a.7) por el ancho de la propia banda $\Delta\lambda$:

$$I_{\lambda} \approx \frac{\frac{d\Phi}{d\lambda} \Delta\lambda}{A \Delta\lambda} \quad (a.8)$$

Al simplificar la expresión, los términos $\Delta\lambda$ se cancelan, resultando en una definición fundamental de irradiancia espectral:

$$I_{\lambda} \approx \frac{1}{A} \frac{d\Phi}{d\lambda} \quad (a. 9)$$

A.1.2 Justificación física

La deducción anterior sigue un proceso de conversión entre densidades y cantidades totales. Se parte de una densidad de potencia (flujo radiante espectral) para, mediante la multiplicación por el ancho de banda, obtener una cantidad de potencia total en esa banda finita. Posteriormente, esta potencia se distribuye sobre una superficie para calcular la irradiancia. Finalmente, se convierte la irradiancia de una banda finita nuevamente a una densidad (irradiancia espectral) al dividirla por el ancho de banda. El resultado final muestra que la irradiancia espectral es, en esencia, la densidad de flujo radiante por unidad de área.

A.3 Ecuación B: Cálculo a partir de la potencia total y parámetros del sistema

Cuando no se dispone del flujo radiante espectral incidente directo, es posible estimar la irradiancia espectral incidente utilizando parámetros conocidos del sistema: la potencia total de la lámpara, su distribución espectral, la transmitancia del monocromador, el área de iluminación y el ancho de banda espectral.

A.2.1 Deducción matemática

El punto de partida es la potencia radiante total de la fuente, Φ , emitida en todas las longitudes de onda. Para encontrar la potencia correspondiente a la longitud de onda de interés, se aplica el factor de distribución espectral de la fuente, S_{λ} , de esta manera se filtra la potencia total para que solo se refleje en la ecuación un porcentaje de esa potencia que corresponde a la forma del espectro de la fuente.

A continuación, se considera la eficiencia del sistema óptico aplicando el factor de transmitancia espectral del monocromador, T_{λ} . El resultado es una aproximación de la

potencia real que sale del monocromador en la banda de interés:

$$\Phi_{\Delta\lambda} \approx \Phi S_{\lambda} T_{\lambda} \quad (a. 10)$$

Esta potencia en la banda se distribuye sobre un área de incidencia A , resultando en la irradiancia promedio en la banda:

$$I_{\Delta\lambda} \approx \frac{\Phi S_{\lambda} T_{\lambda}}{A} \quad (a. 11)$$

Finalmente, para obtener la irradiancia espectral, se normaliza esta irradiancia dividiéndola por el ancho de banda espectral $\Delta\lambda$ en el que fue entregada:

$$I_{\lambda} \approx \frac{\Phi S_{\lambda} T_{\lambda}}{A \Delta\lambda} \quad (a. 12)$$

A.2.2 Justificación física

Este enfoque modela el espectrofotómetro como un sistema de “filtros” en cascada que actúan sobre la potencia total de la fuente. Se parte de la energía total de la fuente (Φ) y se va construyendo hasta obtener la energía útil. El primer filtro es la propia naturaleza de la fuente (S_{λ}), la cual no emite todas las longitudes de onda con la misma potencia. El segundo filtro son las pérdidas del sistema óptico (T_{λ}), que reducen la potencia que llega a la muestra. La potencia resultante, que es la que se entrega en una banda espectral finita, se normaliza por el área de incidencia (A) y el ancho de esa banda ($\Delta\lambda$) para obtener la densidad de irradiancia en el punto y la longitud de onda de interés.

Apéndice B: Ley de Beer-Lambert.

La deducción de la ecuación de la Ley de Beer-Lambert se desarrolla a continuación [14] [40].

Si a una muestra contendida dentro de una celda es dividida en secciones infinitamente delgadas, dx , y a una de esas secciones se le hace incidir un haz de luz con irradiancia espectral I_{λ_o} , físicamente se intuye que la muestra absorberá una pequeña cantidad de radiación, dI_λ , esto significa que deberá ser proporcional a la irradiancia I_{λ_o} y a la concentración del componente absorbente en la muestra, c :

$$dI_\lambda = -K I_{\lambda_o} c dx \quad (b.1)$$

donde K representa una constante de proporcionalidad y el signo negativo indica que conforme dx aumenta, la irradiancia disminuye.

Podemos encontrar la irradiancia espectral total final que emerge después de atravesar todas las secciones al integrar entre los límites de integración I_{λ_o} en $x = 0$ y I_λ en $x = l$:

$$\begin{aligned} \frac{dI_\lambda}{I_\lambda} &= -K c dx \\ \Rightarrow \int_{I_{\lambda_o}}^{I_\lambda} \frac{dI_\lambda}{I_\lambda} &= -K c \int_0^l dx \\ \Rightarrow \ln I_\lambda - (\ln I_{\lambda_o}) &= -Kcl \\ -\ln \frac{I_\lambda}{I_{\lambda_o}} &= Kcl \end{aligned} \quad (b.2)$$

Los instrumentos utilizados para la espectroscopía, los espectrofotómetros, están calibrados utilizando el logaritmo en base 10, debido a la forma en la que se define la absorbancia [37]. Por ello, convertiremos la ecuación (b.2) a un logaritmo base 10 usando la relación $\log z = \frac{\ln z}{\ln 10}$:

$$\Rightarrow -\frac{\ln \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}}}{\ln 10} = \frac{Kcl}{\ln 10}$$

$$-\log \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}} = \frac{K}{\ln 10} cl \quad (b.3)$$

De la ecuación (b.3) podemos percatarnos que la igualdad izquierda es la definición de absorbancia espectral, dada por la ecuación (7), y $K / \ln 10$ es renombrada como la constante de absorción o absortividad α_{λ} . Entonces, la ecuación resultante es conocida como la ley de Beer-Lambert, la cual linealiza la dependencia de la absorbancia con la concentración y longitud del paso óptico:

$$A_{\lambda} = \alpha_{\lambda} cl \quad (b.4)$$

En el caso que se conozca la concentración del componente absorbente de la muestra en unidades de moles por litro (M), la constante de absorción será llamada absortividad molar β , la cual tendrá unidades $M^{-1}cm^{-1}$.

Apéndice C: Deducción para estimar la irradiancia espectral relativa a distintas profundidades usando absorbancia espectral.

A continuación, se demuestra cómo, a partir de mediciones de absorbancia realizadas en una celda con longitud estándar, se puede estimar la irradiancia espectral relativa en profundidades arbitrarias de un cultivo de *Chlorella sp.*.

En el Apéndice B se obtuvo la definición de la ley de Beer-Lambert:

$$A_{\lambda} = \alpha_{\lambda} cz \quad (c.1)$$

donde, α es el coeficiente de absorción, c la concentración celular y z la profundidad óptica. Recordando las definiciones de transmitancia y absorbancia espectral dadas en el capítulo 3.3:

$$T_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}} \quad (c.2)$$

$$A_{\lambda} = -\log T_{\lambda} \quad (c.3)$$

donde I_{λ_o} es la irradiancia incidente sobre el medio e I_{λ} es la irradiancia a una profundidad z , sustituimos (c.2) en (c.3) e igualamos la ecuación resultante en (c.1):

$$A_{\lambda} = -\log \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}}$$

$$\alpha_{\lambda} cz = -\log \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}}$$

Despejamos al logaritmo base 10 y a la irradiancia espectral incidente:

$$10^{-\alpha_{\lambda} cz} = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}}$$

$$I_{\lambda} = I_{\lambda_o} 10^{-\alpha_{\lambda} cz} \quad (c.4)$$

La ecuación (c.4) es la forma tradicional de la ley de Beer-Lambert, la cual describe la atenuación de un haz de luz a medida que atraviesa un medio absorbente.

En espectroscopía, la absorbancia espectral se mide en un espesor fijo l (por lo general la longitud de la celda usada es de 1 cm). Usando la definición de absorbancia para l :

$$A_{\lambda} = \alpha_{\lambda} cl$$

se puede obtener el coeficiente de absorción:

$$\alpha_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{cl} \quad (c.5)$$

Sustituyendo (c.5) en (c.4):

$$I_{\lambda} = I_{\lambda_o} 10^{-\frac{A_{\lambda}}{cl} cz}$$

$$I_{\lambda} = I_{\lambda_o} 10^{-A_{\lambda} \frac{z}{l}}$$

Finalmente, podemos obtener una expresión para la irradiancia relativa:

$$\frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda_o}} = 10^{-A_{\lambda} \frac{z}{l}} \quad (c.6)$$

la cual permite estimar la fracción de la irradiancia transmitida a cualquier profundidad z , a partir de la absorbancia medida experimentalmente en una celda con espesor l .

El coeficiente $\frac{z}{l}$, el cual es adimensional, representa el número de veces que se repite el espesor de la celda en la que se midió la absorbancia dentro de una profundidad z ; el cual respeta la ley exponencial matemática y actúa como una escala logarítmica: indica cuantos bloques de absorción de longitud l hay dentro del espesor total z , lo que permite extender la validez del modelo a cualquier profundidad, sin necesidad de volver a medir la absorbancia en distintos espesores.

Este modelo muestra que la irradiancia decrece de forma exponencial conforme aumenta la profundidad, lo cual es característico de sistemas dominados por la absorción. La absorbancia representa el efecto combinado de la densidad de células presentes en el camino óptico y su capacidad intrínseca de absorber radiación electromagnética (principalmente en UV-VIS).

El modelo es útil cuando se desea estimar la atenuación espectral de la luz en cuerpos de agua o reactores de cultivos, predecir el comportamiento de la irradiancia sin necesidad de conocer el valor absoluto de la irradiancia incidente, y evaluar la distancia de atenuación de la luz utilizando únicamente una medida de absorbancia.

La distancia de atenuación de la luz, o profundidad crítica, se refiere a la distancia dentro de un medio donde la irradiancia ha perdido una fracción significativa de su valor inicial [81]. La penetración óptica es de interés cuando la irradiancia se reduce al 10% y 1% de su valor superficial, ya que a estas profundidades corresponden al punto medio y más bajo de la zona dentro de la cual se produce una fotosíntesis significativa [54]. Entonces, si la irradiancia relativa es de 0.1 y $l = 1$ cm:

$$0.1 = 10^{-A_{\lambda} z}$$

$$1 = A_{\lambda} z$$

$$z = \frac{1}{A_{\lambda}} \quad (c. 7)$$

significa que la profundidad de penetración óptica, para cuando la irradiancia cae al 10% de su valor original, es inversamente proporcional a la absorbancia.

Apéndice D: Procedimientos experimentales para la preparación, mantenimiento y análisis de cultivos de *Chlorella sp.*

D.1 Ensamblaje del sistema de cultivo tipo batch

Con el objetivo de mantener las condiciones controladas de mezcla, aireación y exposición luminosa durante el cultivo de *Chlorella sp.*, se diseñó un sistema tipo batch con tres unidades independientes, utilizando materiales de laboratorio accesibles y una bomba de aire para asegurar la circulación continua de gases en cada matraz.

Materiales utilizados:

- 3 matraces Erlenmeyer de 500 mL
- 3 tapones de hule #8
- Varilla de vidrio hueca de ¼"
- Bomba de aire para peceras de 58W (marca Simple Deluxe)
- Manguera transparente de ¼" (incluida con la bomba)
- Luz LED marca Enbrighten de 13.31W (modelo 52352) y color blanco cálido (3000 K).

Montaje:

1. La varilla de vidrio fue cortada en seis segmentos de aproximadamente 8 cm de longitud.
2. Se realizaron dos perforaciones verticales en cada tapón de hule con un diámetro igual al de la varilla de vidrio, procurando un ajuste hermético.
3. Se insertaron dos trozos de varilla en cada tapón, de modo que sobresalieran simétricamente por ambos extremos.
4. La manguera se cortó en seis tramos: tres de ellos con longitudes variables, determinadas por la distancia entre la bomba y cada matraz; los otros tres, de 15 cm, fueron usados como segmentos internos.
5. En cada tapón, una de las varillas se destinó como entrada de aire. A su extremo interior se conectó una manguera de 15 cm que llegaba al fondo del matraz,

mientras que al extremo exterior se conectó una de las mangueras largas, la cual se enlazó a la bomba de aire. La segunda varilla funcionó como salida de presión, permitiendo la circulación del flujo sin generar sobrepresión en el matraz.

6. Los tres matraces fueron colocados en línea sobre la mesa de trabajo. La lámpara LED se posicionó detrás de los matraces, a la altura del cuello, asegurando una distribución luminosa uniforme. La bomba de aire se ubicó al extremo izquierdo del montaje.
7. La disposición completa puede consultarse en la Figura d.1



Figura d.1: Disposición del sistema de cultivo tipo batch.

Limpieza y preparación del sistema:

Desde el primer uso, y en cada recultivo subsecuente, los componentes del sistema fueron sometidos a un proceso de limpieza previo a su uso experimental. Los matraces, tapones con varillas y segmentos de manguera fueron lavados con agua corriente y detergente tipo lavatrastes, enjuagados abundantemente, y posteriormente sumergidos entre 30 minutos en una solución de agua con cloro. Tras el tratamiento desinfectante, cada componente fue enjuagado con alcohol etílico al 96% y dejado secar al ambiente. Este procedimiento tuvo como objetivo minimizar el riesgo de contaminación microbológica sin recurrir al uso de autoclave.

D.2 Protocolo de aislamiento y selección de cuasi monocultivo microalgal

Con el objetivo de obtener un cultivo lo más homogéneo posible, se diseñó un protocolo de selección progresiva basado en diferencias de comportamiento entre microalgas adheribles y suspendidas en cultivo líquido. El procedimiento tuvo como base el

aislamiento físico y la transferencia de muestras enriquecidas en microalgas de tipo suspendido, seguido de una observación sistemática al microscopio para seleccionar aquellas poblaciones con menor diversidad morfológica visible. El resultado de este proceso fue un cuasi monocultivo de *Chlorella sp.*, apto para ser caracterizado ópticamente en condiciones controladas.

Materiales y equipo utilizados:

- 10 L de agua del estanque del Laboratorio de Ecofisiología Animal
- Filtros de malla fina (#5, #35 y #65)
- Sistema de cultivo tipo batch (como en Apéndice D.1)
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Microscopio óptico (aumentos 20x y 100x)
- Portaobjetos (sin cubreobjetos)

Procedimiento:

1. Recolección y filtrado inicial:
 - Se filtraron 10 litros de agua del estanque usando tres filtros de diferente tamaño de poro (en orden de uso: #5, #35 y #65).
 - Del filtro con el poro más pequeño, se raspó cuidadosamente la capa de microalgas atrapadas y se transfirió a un matraz con medio Basal de Bold.
2. Primer cultivo y separación de microalgas suspendidas:
 - Después de una semana de crecimiento con aireación, se observó visualmente la coexistencia de microalgas que crecían adheridas a las paredes y otras suspendidas en el medio.
 - Se interrumpió el flujo de aire durante 30 minutos, permitiendo que las microalgas adheribles y partículas pesadas se asentaran.
 - Se extrajo con pipeta una muestra de la zona superficial, rica en microalgas preferentemente suspendidas, y se inoculó en un nuevo matraz con medio fresco.

3. Enriquecimiento progresivo:

- El procedimiento anterior se repitió semanalmente: en cada nuevo cultivo, se interrumpía el flujo de aire, se dejaba sedimentar el contenido, y se extraía nuevamente una muestra superficial.
- En cada generación, se observó bajo el microscopio (aumentos 20x y 100x) una gota representativa de la muestra, evaluando la homogeneidad morfológica de las microalgas.
- Se seleccionaba la gota con menor variedad visible de especies y con predominancia de células suspendidas para inocular el siguiente cultivo.
- Este procedimiento se repitió durante varias semanas hasta que ya no se observaron microalgas adheribles bajo el microscopio.

4. Criterios de selección microscópica:

- Las observaciones se realizaron sin cubreobjetos para evitar aplastamiento de las células e inocular con mayor facilidad.
- Las gotas seleccionadas mostraban una alta proporción de células pequeñas, esféricas, y verdes, compatibles con la morfología típica de *Chlorella sp.*
- Se conservaba siempre el cultivo de la semana anterior como respaldo, en caso de que el nuevo cultivo no presentara crecimiento adecuado.

5. Identificación del morfotipo dominante:

- Una vez eliminadas visualmente las microalgas adheribles, las muestras fueron extraídas sin necesidad de detener el flujo de aire.
- En esta fase, se realizó una caracterización preliminar microscópica, identificando que el morfotipo dominante correspondía a *Chlorella sp.*
- A partir de ahí, se siguió el mismo protocolo: elegir gotas con la menor diversidad posible morfológica en las que predominara *Chlorella sp.* para continuar con la línea de cultivo.

Observaciones:

Durante el proceso de selección se observaron organismos del género *Euglena sp.*, cuya presencia fue reducida pero no completamente eliminada. Se estima que su densidad es muy baja en comparación con la microalga dominante, y su proporción será reportada en la sección de resultados. Asimismo, se detectó la presencia de estructuras mucilaginosas (*mucílago sp.*), posiblemente generadas por *Chlorella sp.* en ciertas fases del cultivo.

D.3 Preparación de medio de cultivo Basal de Bold

Para el desarrollo del cultivo de *Chlorella sp.*, se utilizó como medio nutritivo el medio Basal de Bold, cuya composición está descrita en la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010.

Preparación de las soluciones stock.

La norma especifica la preparación de diez soluciones stock, cada una con una concentración definida de sales o compuestos específicos, disueltas en 100 mL de agua desionizada o destilada. Para cada solución se procedió de la siguiente manera:

1. Se pesó la cantidad correspondiente de cada reactivo según la Tabla 1.
2. Cada reactivo se disolvió por separado en un vaso de precipitado con 100 mL de agua e-pura desionizada, utilizando un agitador magnético con calefacción. La temperatura se mantuvo a 150 °C hasta lograr una disolución completa.
3. Una vez disueltos, los contenidos fueron transferidos a frascos de vidrio ámbar previamente limpios y secos.
4. Los frascos fueron esterilizados en horno de microondas durante 1 minuto.
5. Cada frasco fue etiquetado con el número de solución stock correspondiente.
6. Tras enfriarse los frascos a temperatura ambiente, se almacenaron bajo refrigeración a una temperatura mínima de aproximadamente 4 °C.

Tabla D.1: Cantidad de reactivos que contiene cada solución stock de 100 mL para preparar Medio Basal de Bold.

Disolución stock	Reactivo	Peso (g)
1	Nitrato de sodio (NaNO_3)	25.0
2	Cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.5
3	Sulfato de magnesio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7.5
4	Fosfato mono básico de potasio (KH_2PO_4)	17.5
5	Fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4)	7.5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2.5
7	Sulfato ferroso hepta hidratado (•) + 100 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)	0.498
8	Ácido bórico (H_3BO_3)	1.142
9	EDTA	5.0
	Hidróxido de potasio (KOH)	3.1
	Sulfato de zinc hepta hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.882
	Cloruro de manganeso tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.144
10	Óxido de molibdeno (MoO_3)	0.071
	Sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.157
	Nitrato de cobalto hexa hidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.049

Preparación del medio de cultivo final.

Para la elaboración del medio de cultivo a utilizar en los matraces se realizó lo siguiente:

1. Se midieron 495 mL de agua e-pura desionizada, los cuales se colocaron en un matraz conectado al sistema de aireación.
2. Con el sistema en funcionamiento, es decir, con el agua agitándose por aireación incidente, se agregó 0.5 mL de cada una de las soluciones stock, en orden del 1 al 10.
3. Antes de agregar cada solución, se agitó su frasco para homogeneizar posibles asentamientos en el fondo.
4. La mezcla se dejó airear durante minutos adicionales, asegurando una distribución uniforme de los componentes en el volumen total de 500 mL.
5. Una vez completada la mezcla, el matraz con el medio de cultivo fue llevado al microondas y sometido a hervor durante 2 minutos. Este paso tiene el objetivo de reducir la carga microbiana y de hongos en el medio, funcionando como un

mecanismo adicional de desinfección térmica.

6. Después del hervido, el medio se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de ser usado.

Adicional, se usaron pipetas de 1ml de plástico para extraer la solución stock de cada frasco a los matraces. Cada pipeta fue etiquetada con el número de un frasco para uso exclusivo en estos.

D.4 Mantenimiento de cultivos en condiciones controladas

El mantenimiento del cuasi monocultivo de *Chlorella sp.* requirió una estrategia sistemática de recultivo semanal, combinada con controles básicos de higiene para minimizar la introducción de contaminantes por la vía aérea. A continuación, se describen las acciones implementadas para asegurar continuidad, estabilidad y limpieza del sistema de cultivo.

Filtrado del aire de entrada

Para prevenir la introducción de esporas, bacterias u otros microorganismos a través del sistema de aireación, se implementó un sistema de filtrado físico improvisado. En cada salida de aire de la bomba se colocaron bolas de gasa estéril, dejando parte de las hebras entre la salida de aire y la manguera de silicón. Esta disposición tuvo como objetivo impedir que la presión del aire empujara completamente la gasa hacia el interior de la manguera y, eventualmente, hasta el matraz. Esta barrera textil actuó como filtro de partículas gruesas, reduciendo el riesgo de contaminación durante la aireación continua del cultivo.

Ciclo semanal de recultivo

Una vez logrado el cuasi monocultivo, se estableció un esquema de recultivo semanal y escalonado que permitía mantener al mismo tiempo cultivos en diferentes fases de crecimiento. Cada semana se trabajó con tres matraces activos: un matraz con dos semanas de crecimiento y dos matraces con una semana de crecimiento.

De los cultivos de una semana, se seleccionaba uno como cultivo madre, con previa revisión al microscopio óptico (aumentos 20x y 100x), para verificar que aún presentara características compatibles con un cuasi monocultivo dominado por *Chlorella sp.*. Este cultivo madre se utilizaba para inocular los nuevos medios preparados esa semana y como respaldo en caso de que los nuevos cultivos no presentaran crecimiento adecuado al término de la siguiente semana. Los otros dos cultivos (el más antiguo y el cultivo descartado entre los jóvenes) eran eliminados.

Inoculación

Para cada nuevo matraz se utilizaron 5 mL del cultivo madre, los cuales se añadieron directamente al medio de cultivo recién preparado (ver Apéndice D.3).

D.5 Preparación y manejo de muestras para análisis óptico

Con el fin de obtener resultados espectrales reproducibles y representativos del comportamiento óptico de cultivos de *Chlorella sp.*, se implementó un protocolo de preparación y análisis de muestras que garantiza homogeneidad, estabilidad y trazabilidad de las condiciones bajo las cuales fueron tomadas.

Criterios previos a la toma de muestras.

Antes de poder proceder a cualquier medición óptica, se verificó que el cultivo cumpliera con los siguientes requisitos:

1. Contar con un cuasi monocultivo de *Chlorella sp.* conforme a los protocolos descritos en los Apéndices D.2 (selección), D.3 (preparación del medio) y D.4 (mantenimiento y recultivo).
2. Mantenimiento del cultivo en condiciones controladas de temperatura e iluminación. Para monitorear estas variables, se utilizó un sistema de sensado del Kit IoT de Arduino, el cual registró datos ambientales en tiempo real. El código para este sistema se presenta en el apéndice E.

Preparaciones de diluciones:

De uno de los matraces jóvenes se seleccionó la muestra a analizar. Se extrajo el

contenido necesario y se prepararon cuatro viales de vidrio con los siguientes volúmenes:

- Muestra 1: 4 mL directamente extraídos del matraz.
- Muestra 2: 3 mL del cultivo + 1 mL de agua e-pura desionizada.
- Muestra 3: 3 mL del cultivo + 2 mL de agua e-pura desionizada.
- Muestra 4: 1 mL del cultivo + 3 mL de agua e-pura desionizada.

Cada muestra fue agitada suavemente (con una pipeta de 0.2 mL para cada muestra) para garantizar una mezcla homogénea antes del análisis.

Conteo celular previo al análisis óptico

Para correlacionar los datos ópticos con la densidad celular, se realizó el conteo celular de tres muestras obtenidas directo del matraz del cultivo, utilizando una cámara de Neubauer mejorada. Las observaciones se realizaron al microscopio óptico, registrando el número de células por unidad de volumen para determinar la concentración promedio.

La geometría de la cámara implica un volumen por cuadrado grande de 10^{-4} mL, y el cuadrado pequeño de 4×10^{-6} mL, de modo que la concentración celular en células por mililitro se calculó como:

$$C = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Número de cuadrados}} (10,000) \quad (D.1)$$

$$C = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Número de cuadrados}} (250,000) \quad (D.2)$$

La ec. D.1 se usó para obtener la concentración de *Euglena sp.* y la ec. D.2 en la concentración de *Chlorella sp.*

Medición espectral

Posteriormente, cada muestra fue analizada en el espectrofotómetro usando una celda

de cuarzo de 1 cm de espesor, registrando los valores de absorbancia y transmitancia en el rango espectral de 800 a 200 nanómetros. Los espectros obtenidos sirvieron para analizar la relación entre concentración, absorbancia y atenuación espectral en los modelos desarrollados en los capítulos posteriores.

Apéndice E: Sistema de monitoreo ambiental con Arduino IoT Kit.

Con el objetivo de garantizar que las condiciones ambientales se mantuvieran estables y controladas durante el cultivo de microalgas, se implementó un sistema de monitoreo continuo utilizando el Arduino MKR IoT Carrier. Este sistema permitió registrar variables clave como la temperatura, humedad relativa, presión atmosférica y nivel de luz visible (lux) dentro del entorno experimental.

Componentes utilizados:

- Placa Arduino MKR WiFi 1010
- Módulo Arduino MKR IoT Carrier
- Cable micro-USB
- Plataforma Arduino IDE
- Programa PLX-DAQ v2.11

Descripción funcional:

El sistema registró automáticamente las siguientes variables ambientales:

- Temperatura (°C)
- Humedad relativa (%)
- Presión atmosférica (hPa)
- Iluminancia (lux)

Las mediciones se realizaron cada 10 minutos (600,000 ms) y transmitieron por el puerto serial, integrándose en tiempo real en una hoja de cálculo Excel mediante el

software PLX-DAQ. Además, se registraron automáticamente la fecha y hora del sistema desde la computadora, añadiendo precisión temporal a cada medición.

Código fuente:

A continuación, se muestra el código Arduino utilizado para el monitoreo:

```
1 #include <Arduino_MKRIoTCarrier.h>
2
3 MKRIoTCarrier carrier;
4
5 float temperature = 0;
6 float humidity = 0;
7 float pressure = 0;
8 int light = 0;
9 int r,g,b;
10
11 void setup() {
12   Serial.begin(9600);
13
14   CARRIER_CASE = true;
15   carrier.begin();
16
17   Serial.println("LABEL, Fecha, Hora, Temperatura   C°, Humedad   %, Presión,
18 Luz visible (LUX)");
19 }
20
21 void loop() {
22   temperature = carrier.Env.readTemperature();
23   humidity = carrier.Env.readHumidity();
24   pressure = carrier.Pressure.readPressure();
25
26   while(!carrier.Light.colorAvailable())
27   {
28     delay (5);
29   }
30   carrier.Light.readColor(r, g, b, light);
31
32   Serial.print("DATA, DATE, TIME, ");
33   Serial.print(temperature);
34   Serial.print(", ");
35   Serial.print(humidity);
36   Serial.print(", ");
37   Serial.print(pressure);
38   Serial.print(", ");
39   Serial.println(light);
40   delay(600000);
41 }
```

Observaciones:

Este sistema fue implementado durante las fases de crecimiento del cultivo, confirmando que las condiciones de temperatura e iluminación se mantuvieron dentro de los rangos establecidos.

Apéndice F: Programa para el cálculo de coeficientes de absorción

Este apéndice contiene el programa desarrollado en C# para calcular los coeficientes de absorción espectral de *Chlorella sp.* a partir de los espectros de absorbancia corregida. Este coeficiente representa la contribución de la absorbancia por unidad de concentración molecular y es proporcional a la absortividad del cultivo.

Funcionamiento:

El programa lee un archivo de texto con extensión .txt que contiene, en formato tabulado, la longitud de onda en la primera columna y las absorbancias corregidas de las cuatro muestras en las siguientes columnas.

A cada valor de la absorbancia se le asocia la concentración celular correspondiente. Después, para cada longitud de onda y concentración, el programa calcula el coeficiente de absorción, α_λ , usando la siguiente ecuación:

$$\alpha_\lambda = \frac{A_\lambda}{c}$$

donde A_λ es la absorbancia espectral corregida y c la concentración celular (cel/mL). Esta ecuación se obtiene despejando el coeficiente de absorción de la ec.(8) y estableciendo el valor del ancho de la celda a $l = 1$.

Los resultados se guardan en un nuevo archivo de salida, en el que cada fila contiene la longitud de onda y los coeficientes de absorción para las cuatro concentraciones.

Requisitos para ejecución:

- Lenguaje de programación: C#
- Archivo de entrada: texto plano (.txt) con columnas separadas por tabulaciones. La primera columna corresponde a la longitud de onda (nm), y las cuatro columnas siguientes a la absorbancia corregida para cada una de las muestras, ordenadas de menor a mayor concentración.
- Rutas de entrada y salida, y concentraciones deben configurarse en el código antes de ejecutar.
- El programa se compila y ejecuta desde Visual Studio.

Código fuente:

```
1 using System;
2 using System.Collections.Generic;
3 using System.Globalization;
4 using System.IO;
5 using System.Linq;
6 using System.Text;
7 using System.Threading.Tasks;
8
9 namespace CoeficientesAbsorbancia
10 {
11     internal class Program
12     {
13         static void Main(string[] args)
14         {
15             //Ruta del archivo de entrada y salida
16             string InputPath = @"C:\Users\cochi\source\repos\Tesis
17             2025\AbsorbanciaCorregida14Oct.txt";
18             string OutputPath = @"C:\Users\cochi\source\repos\Tesis
19             2025\CoefAbsorbCorregida14oct.txt";
20
21             //Concentraciones
22             int[] Con = { 7362500, 14725000, 22087500, 29450000 };
23
24             //Código para escribir en el archivo de salida
25             try
26             {
27                 using (StreamWriter writer = new StreamWriter(OutputPath))
28                 {
29                     //Escritura de la cabecera de las columnas: Wavelength, Conc1_z1,
30                     Conc1_z2, ..., Conc4_z5
31                     writer.Write("Wavelength");
32                     for (int conc = 1; conc <= 4; conc++)
33                     {
```

```

31 writer.Write($"\\tConc{conc}");
32 }
33 writer.WriteLine();
34
35 //Para leer las líneas de absorbancia
36 foreach (var line in File.ReadAllLines(InputPath))
37 {
38     //Omitimos líneas del archivo vacías o que contengan espacios en
    blanco
39     if (string.IsNullOrEmpty(line))
40     {
41         continue;
42     }
43
44     /* Se divide la cadena line cada vez que encuentre un tab o espacio,
45     además garantizamos
46     que no se incluya en el array los elementos vacíos. EL array parts
47     tendrá 4 elementos,
48     el primero es la longitud de onda y los siguientes las absorbancias.
49     */
50     var parts = line.Split(new[] { '\\t' },
51     StringSplitOptions.RemoveEmptyEntries);
52
53     // Parseamos los elementos del array parts
54     double wavelenght = double.Parse(parts[0],
55     CultureInfo.InvariantCulture);
56     double[] absorbances = new double[4];
57     for (int i = 0; i < 4; i++)
58     {
59         absorbances[i] = double.Parse(parts[i + 1],
60         CultureInfo.InvariantCulture);
61     }
62
63     //Escribe la longitud de onda en la primera columna
64     writer.Write(wavelenght.ToString("F1",
65     CultureInfo.InvariantCulture));
66
67     //Cálculo de los coeficientes de absorción para cada concentración
68     for (int i = 0; i < 4; i++)
69     {
70         // Coef = A / C
71         double Coef = absorbances[i] / Con [i];
72         writer.Write("\\t" + Coef.ToString("E3",
73         CultureInfo.InvariantCulture));
74     }
75
76     writer.WriteLine();
77 }
78 }
79 }
80 catch (Exception ex)
81 {

```



```

74 Console.WriteLine($"Error al leer el archivo: {ex.Message}");
75 }
76
77 Console.WriteLine("Cálculo completado. Resultados en: " + OutputPath);
78 Console.ReadKey();
79 }
80 }
81 }

```

Apéndice G: Programa para el cálculo de la irradiancia espectral relativa (atenuación de la luz)

Este programa fue diseñado en C# para modelar la atenuación de la luz en función de la profundidad. El programa calcula la irradiancia espectral relativa, que representa la fracción de la luz que se transmite a una profundidad determinada. El cálculo usa la ec. (10), obtenida en el apéndice C, y utiliza los espectros de absorbancia corregida como datos de entrada.

Funcionamiento:

El programa lee el mismo archivo de entrada que el código del Apéndice F. Se definen las profundidades de intrépido (1-5 cm) y la longitud de camino óptico la celda ($l = 1$ cm).

Para cada longitud de onda, concentración y profundidad, el programa calcula la irradiancia relativa espectral usando la ec. (c.6):

$$I_{rel\lambda} = (100)10^{-A_{\lambda}\frac{z}{l}}$$

donde A_{λ} es la absorbancia corregida, z la profundidad (cm) y l el espesor de la celda (cm). El factor 100 expresa el resultado en porcentaje relativo de la irradiancia inicial.

Los resultados son escritos en un archivo de salida que contienen la longitud de onda

en la primera columna, y, en las columnas siguientes, los valores de irradiancia relativa para cada concentración y profundidad.

Requisitos para ejecución:

- Lenguaje de programación: C#.
- Archivo de entrada: texto plano (.txt) con columnas separadas por tabulaciones. La primera columna corresponde a la longitud de onda (nm), y las cuatro columnas siguientes a la absorbancia corregida para cada una de las muestras, ordenadas de menor a mayor concentración.
- Rutas de entrada y salida, concentraciones, profundidades y longitud de celda deben configurarse en el código antes de ejecutar.
- El programa se compila y ejecuta desde Visual Studio.

Código fuente:

```
1 using System;
2 using System.Collections.Generic;
3 using System.Linq;
4 using System.Text;
5 using System.Threading.Tasks;
6 using System.IO;
7 using System.Diagnostics;
8 using System.Globalization;
9
10 namespace IrradianciaEspectral
11 {
12     internal class Program
13     {
14         static void Main(string[] args)
15         {
16             //Ruta del archivo de entrada y salida
17             string InputPath = @"C:\Users\cochi\source\repos\Tesis
18 2025\AbsorbanciaCorregida14Oct.txt";
19             string OutputPath = @"C:\Users\cochi\source\repos\Tesis
20 2025\IrradianciaRelativaCorregida14Oct.txt";
21
22             //Profundidades a evaluar (cm)
23             int[] Depths = { 1, 2, 3, 4, 5 };
24             double CellLength = 1.0;
25
26             //Código para escribir en el archivo de salida
27             try
28             {
```

```

27 using (StreamWriter writer = new StreamWriter(OutputPath))
28 {
29 //Escritura de la cabecera de las columnas: Wavelength, Conc1_z1,
    Conc1_z2, ..., Conc4_z5
30 writer.Write("Wavelength");
31 for (int conc = 1; conc <= 4; conc++)
32 {
33 for (int z = 1; z <= 5; z++)
34 {
35 writer.Write($"\\tConc{conc}_z{z}");
36 }
37 }
38 writer.WriteLine();
39
40 //Para leer las líneas de absorbancia
41 foreach (var line in File.ReadAllLines(InputPath))
42 {
43 //Omitimos líneas del archivo vacías o que contengan espacios en
    blanco
44 if (string.IsNullOrEmpty(line))
45 { continue;
46 }
47
48 /* Se divide la cadena line cada vez que encuentre un tab o espacio,
    además garantizamos
49 que no se incluya en el array los elementos vacíos. EL array parts
    tendrá 4 elementos,
50 el primero es la longitud de onda y los siguientes las absorbancias.
    */
51 var parts = line.Split(new [] { '\\t' },
    StringSplitOptions.RemoveEmptyEntries);
52
53 // Parseamos los elementos del array parts
54 double wavelength = double.Parse(parts[0],
    CultureInfo.InvariantCulture);
55 double[] absorbances = new double[4];
56 for (int i = 0; i < 4; i++)
57 {
58 absorbances[i] = double.Parse(parts[i+1],
    CultureInfo.InvariantCulture);
59 }
60
61 //Escribe la longitud de onda en la primera columna
62 writer.Write(wavelength.ToString("F1",
    CultureInfo.InvariantCulture));
63
64 //Cálculo de la irradiancia espectral relativa para cada
    concentración y profundidad
65 foreach (var A in absorbances)
66 {
67 foreach (var z in Depths)
68 {

```

```

69 //I_rel = 10^(-A*(z/l))
70 double Irel =100*Math.Pow(10.0, -A * z/CellLenght);
71 writer.Write("\t" + Irel.ToString("E3",
    CultureInfo.InvariantCulture));
72 }
73 }
74
75 writer.WriteLine();
76 }
77 }
78 }
79 catch (Exception ex)
80 {
81     Console.WriteLine($"Error al leer el archivo: {ex.Message}");
82 }
83 Console.WriteLine("Cálculo completado. Resultados en: " +
84 OutputPath);
85 Console.ReadKey();
86 }
87 }
88 }

```

9 Bibliografía

- [1] R. B. Baird, A. D. Eaton and E. W. Rice, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23th ed., Washington: Amer Public Health Assn, 2017.
- [2] M. G. Martínez Hernández, "Efecto de la turbidez en el comportamiento de selección sexual de *Girardinichthys multiradiatus*, (Meek, 1994) (Pisces: Goodeidae) en la Microcuenca Toluca-Ixtlahuaca," Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México, 2018.
- [3] W. Zhang, D. Zhang, B. Shi and Z. Zhao, "Laboratory experiments to assess the effect of *Chlorella* on turbidity measurement," *Walter*, vol. 14, no. 19, Art. no 3184, 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/w14193184>.
- [4] H. Yang and J. Yee, "Determination of microalgae concentration by use of turbidity measurement," IFAS Extension, University of Florida, Publication FR466, 2018. [Online]. Available: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FR466>.
- [5] C. Nieman, A. L. Opplinger, C. C. McElwain and S. M. Gray, "Visual detection thresholds in two trophically distinct fishes are compromised in algal compared to sedimentary turbidity," *Conservation Physiology*, vol. 6, no. 1, coy044, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/conphys/coy044>.
- [6] S. Sohel and K. Lindström, "Algal turbidity reduces risk assessment ability of three-spined stickleback," *Ethology*, vol. 11, no. 6, pp. 548-555, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/eth.12370>.
- [7] J. Engström-Öst, M. Öst and M. Yli-Renko, "Balancing algal toxicity and turbidity with predation risk in the three-spine stickleback," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 377, pp. 54-59, 2009. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.06.020>.
- [8] N. F. Manning, J. M. Bossenbroek, C. M. Mayer, D. B. Bunnell, J. T. Tyson, L. G. Rudstam and J. R. Jackson, "Modeling turbidity type and intensity effects on the growth and starvation mortality of age-0 yellow perch," *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 71, no. 10, pp. 1544-1553, 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0528>.
- [9] M. Salonen, L. Urho and J. Engström-Öst, "Effects of turbidity and zooplankton availability on the condition and prey selection of pike larvae," *Boreal Environment Research*, vol. 14, pp. 981-989, 2009. [Online]. Available: <https://www.borenv.net/BER/archive/pdfs/ber14/ber14-981.pdf>.
- [10] C. Pasparakis, T. Lohroff, F. Biefel, D. E. Cocherell, E. W. Carson, T.-C. Hung, R. E. Connon, N. A. Fanguie and A. E. Todgham, "Effects of turbidity, temperature and predation cue on the stress response of juvenile Delta Smelt," *Conservation Physiology*, vol. 11, no. 1, coad036, 2023. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/conphys/coad036>.
- [11] M. Järvenpää, B. Diaz Pauli and K. Lindström, "Water turbidity constrains male mating success in a marine fish," *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 73, Art. no. 140, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2752->

2.

- [12] C. Macías García and T. Burt de Perera, "Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish," *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 52, no. 1, pp. 1-6, 2002.
- [13] The Imagine Team, "The Electromagnetic Spectrum," NASA, March 2013. [Online]. Available: <https://imagine.gsfc.nasa.gov/science/toolbox/emspectrum1.html>. [Accessed 5 January 2024].
- [14] M. García Fabila, "Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS)," Apuntes de posgrado, Facultad de química, Universidad Autónoma del Estado de México, 2016.
- [15] E. Hecht, "Óptica", 5th ed., Madrid: Pearson Educación, 2017.
- [16] R. Resnick, D. Halliday and K. S. Krane, "Física", 5th ed., vol. 2, Ciudad de México: Grupo Editorial Patria, 2002.
- [17] R. A. Serway and J. W. Jewett, "Física para ciencias e ingeniería", 10th ed., vol. 2, Ciudad de México: Cengage, 2019.
- [18] World Health Organization, "Artificial tanning sunbeds : risks and guidance," World Health Organization, Geneva, 2003.
- [19] S. Valdéz Alvarado and D. A. Castelán Garduño, "Introducción a la Física Cuántica," 2020. [Online].
- [20] S. Valdéz Alvarado, "Física cuántica," Apuntes de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, 2021.
- [21] R. Eisberg and R. Resnick, "Física Cuántica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos y Partículas", First ed., México: Limusa, 2000.
- [22] J. Medina-Valtierra, "Características y Propiedades de los Orbitales Atómicos y Moleculares," *Conciencia Tecnológica*, no. 64, pp. 1-7, 2022. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/944/94474222005/94474222005.pdf>. [Accessed 30 January 2025].
- [23] K. W. Whitten, R. E. Davis, M. L. Peck and G. G. Stanley, "Química", 10th ed., México: Gengage Learning, 2015.
- [24] J. Sal, "Orbitals," Khan Academy, 2016. [Online]. Available: https://es.khanacademy.org/science/ap-chemistry/electronic-structure-of-atoms-ap/electron-configurations-jay-sal-ap/v/orbitals?utm_source=chatgpt.com. [Accessed 5 January 2025].
- [25] LibreTexts, "Configuraciones de electrones y diagramas orbitales electrónicos (Revisión)," LibreTexts Química Orgánica, 2023. [Online]. Available: https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica/Mapa%3A_Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_%28Wade%29/01%3A_Introducci%C3%B3n_y_Revisi%C3%B3n/1.04%3A_Configuraciones_de_electrones_y_diagramas_orbitales_electr%C3%B3nicos_%28Revisi%C3%B3n%29?utm_s. [Accessed 5 January 2025].
- [26] L. A. Vicente Hinestroza , "Estructura de la Materia," Facultad de Química,

- Universidad Nacional Autónoma de México, 2009. [Online]. Available: https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/15420/mod_resource/content/1/libro-estructura-LVH_22747.pdf. [Accessed 5 January 2025].
- [27] S. Valladares, "3. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION MOLECULAR ULTRAVIOLETAVISIBLE," FAO, [Online]. Available: <https://www.fao.org/4/ab482s/AB482S03.htm#ch3..> [Accessed 28 January 2025].
- [28] OpenStax, "Teoría de los orbitales moleculares," Química 2ed, 2022. [Online]. Available: https://openstax.org/books/qu%C3%ADmica-2ed/pages/8-4-teoria-de-los-orbitales-moleculares?utm_source=chatgpt.com. [Accessed 13 February 2025].
- [29] B. Valeur, "Absorption of UV-visible light," in *Molecular Fluorescence*, Weinheim, WILEY-VCH, 2002, pp. 20-33.
- [30] "ENLACES QUÍMICOS," [Online]. Available: https://finis.cl/images/futuros_alumnos/profesores_orientadores/material-pedagogico/Guia_3_Enlaces_quimicos.pdf. [Accessed 18 February 2025].
- [31] D. A. Skoog, F. J. Holler and R. C. Stanley, Principios de análisis instrumental, 7th ed., Ciudad de México: Cengage Learning , 2018.
- [32] N. Abril Díaz, J. A. Bárcena Ruiz, E. Fernandez Reyes, A. Galván Cejudo, J. Jorrín Novo, J. Peinado Peinado, F. Toribio Meléndez-Valdés and I. Túnez Fiñana, "Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas," Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, 2005. [Online]. Available: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf. [Accessed 18 February 2025].
- [33] G. Fernandez, "Transiciones electrónicas en espectroscopía Vis-Uv," La Química Orgánica , 2 March 2024. [Online]. Available: https://www.quimicaorganica.net/transiciones-electronicas-espectroscopia-vis-uv.html#google_vignette. [Accessed 18 February 2025].
- [34] A. del Mazo Vivar, "Esparcimiento de Rayleigh," *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, vol. 13, no. 2, pp. 505-510, 2016.
- [35] Goong.com, "scattering Significado En Español," Goong.com - Diccionario de Nueva Generación, 2024. [Online]. Available: [https://goong.com/es/word/scattering_significado_en_espa%C3%B1ol/#:~:text=Definici%C3%B3n%3A%20El%20t%C3%A9rmino%20E2%80%9Cscattering%E2%80%9D%20se,personas%20en%20un%20%C3%A1rea%20determinada](https://goong.com/es/word/scattering_significado_en_espa%C3%B1ol/#:~:text=Definici%C3%B3n%3A%20El%20t%C3%A9rmino%20E2%80%9Cscattering%E2%80%9D%20se,personas%20en%20un%20%C3%A1rea%20determinada.). [Accessed 26 February 2025].
- [36] "Dispersión de Mie," Virtual Laboratory for Satellite Meteorology, RAMMB, CIRA, Colorado State University, 2004. [Online]. Available: https://rammb.cira.colostate.edu/wmovl/vrl/tutorials/euromet/courses/spanish/satmet/s2400/s2400005.htm?utm_source=chatgpt.com. [Accessed 27 February 2025].
- [37] Velab, "Manual de uso del Espectrofotómetro VE-5100UV," 2024. [Online]. Available:

- https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/18105/mod_resource/content/2/Manual%20UV-VIS.pdf. [Accessed 4 March 2025].
- [38] Centro Nacional de Metrología (CENAM), "Patrón Nacional de Irradiancia Espectral," CNM-PNF-6, 2018. [Online]. Available: <https://www.cenam.mx/publicaciones/descargas/PDFFiles/cnm-pnf-6.PDF>. [Accessed 4 March 2025].
- [39] D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5th ed., México: Cengage Learning, 2001.
- [40] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed., New York : W. H. Freeman and Company, 2010.
- [41] C. D. Mobley, *Light and Water: Radiative Transfer in Natural Waters*, Michigan: Academic Press, 1994.
- [42] C. N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, 3rd ed., United Kingdom: McGraw-Hill, 1972.
- [43] Edinburgh Instruments, "The Beer-Lambert Law," Edinburgh Instruments, 15 January 2021. [Online]. Available: <https://www.edinst.com/us/blog/the-beer-lambert-law/#:~:text=The%20Beer%2DLambert%20law%20states,calculated%20by%20measuring%20its%20absorbance..> [Accessed 25 January 2024].
- [44] L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, 2nd ed., Pisa: CRS Press, 2014.
- [45] R. E. Lee, *Phycology*, 4th ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- [46] L. E. Graham and L. W. Wilcox, *Algae*, 1st ed., New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- [47] N. E.-A. El-Naggar, M. H. Hussein, S. A. Shaaban-Dessuuki and S. R. Dalal, "Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth," *Scientific Reports*, 2020.
- [48] H. Sekimoto, J. Abe and Y. Tsuchikane, "Mechanism of sexual reproduction in freshwater microalgae," in *Sexual Reproduction in Animals and Plants*, H. Sawada, N. Inoue and M. Iwano, Eds., Florida, USA, CRC Press / Taylor & Francis, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1201/b16535-2>.
- [49] J. Masojídek, M. Koblizek and G. Torzillo, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 1st ed., Oxford: John Wiley & Sons, 2004.
- [50] Khan Academy, "Luz y pigmentos fotosintéticos," Khan Academy, 2023. [Online]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-and-photosynthetic-pigments>. [Accessed 9 April 2025].
- [51] E. Manrique Reol, "Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis," *Ecosistemas*, vol. XII, no. 1, pp. 1-11, 2003.
- [52] R. Estévez Santiago, "Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana," Madrid, 2016.
- [53] Plant & Soil Sciences eLibrary, «Carotenoides,» Universidad de Nebraska-

- Lincoln, 2025. [En línea]. Available: <https://passel2.unl.edu/view/lesson/ae42848963d4/4#:~:text=La%20mayor%C3%ADa%20de%20los%20carotenoides,rojo%20del%20tomate%2C%20llamado%20licopeno..> [Último acceso: 9 April 2025].
- [54] J. T. O. Kirk, *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, 3rd ed., New York: Cambridge University Press, 2011.
- [55] J. D. Wehr, R. G. Sheath y J. P. Kocielek, *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*, 2nd ed., Academic Press, 2015.
- [56] W. Babiak and I. Krezeminska, "Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes," *Energies*, vol. 14, no. 13, p. 4007, July 2021.
- [57] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz and J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 5th ed., Washington: Cengage Learning, 2014.
- [58] R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 2nd ed., Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2014.
- [59] R. Croce and H. van Amerongen, "Natural strategies for photosynthetic light harvesting," *Nature Chemical Biology*, vol. 10, no. 7, pp. 492-501, 2014.
- [60] T. Renger and F. Müh, "Understanding photosynthetic light-harvesting: a bottom up theoretical approach," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 10, pp. 3348-3371, 2013.
- [61] J. Zvezdanović y D. Marković, «Bleaching of chlorophylls by UV irradiation in vitro: the effects on chlorophyll organization in acetone and n-hexane,» *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 73, n° 3, pp. 271-282, 2008.
- [62] M. Janssen, "Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield," Tesis Doctoral, Wageningen University, Wageningen, Países Bajos, 2002.
- [63] J. Carmona Jiménez, M. A. Hernández Muñoz and M. Ramírez Vázquez, *Algas...glosario ilustrado*, 1st ed., Universidad Nacional Autónoma de México, 2023.
- [64] National Geographic Society, "Abiotic factor," National Geographic Education, 2023. [Online]. Available: <https://education.nationalgeographic.org/resource/resource-library-abiotic-factor/>.
- [65] Quimica.es, "Cromóforo," Encyclopedia of Chemistry, 2024. [Online]. Available: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Crom%C3%B3foro.html>.
- [66] NAL Agricultural Thesaurus Users, "cultivo axénico," Tesauro Agrícola (NAL Agricultural Thesaurus), Servicio de Investigación Agrícola, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)) 2019. [Online]. Available: <https://lod.nal.usda.gov/nalt/es/page/14256>. [Accessed 5 May 2025].
- [67] M. G. I. Calcáneo Garcés and B. L. de la Cueva Barajas, "Características generales de los tres dominios," Portal Académico del CCH, UNAM, 2021. [Online]. Available: <https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia2/caracteristicas-generales-dominios-y-reinos/caracteristicas-generales-tres-dominios>.

- [Accessed 2 April 2025].
- [68] Museo Nacional de Historia Natural, "¿Qué es y cómo determinamos una especie?," MNHN Chile, 17 July 2020. [Online]. Available: <https://www.mnhn.gob.cl/noticias/que-es-y-como-determinamos-una-especie>. [Accessed 2 April 2025].
- [69] A. G. Moreno, "Zoología: Estudio científico de los animales," Universidad Complutense de Madrid, 2003. [Online]. Available: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/465-2013-08-22-A1%20ZOOLOGIA%20generalidades.pdf>. [Accessed 2 April 2025].
- [70] Quimica.es, «Fotótrofo,» Encyclopedia of Chemistry, 2024. [Online]. Available: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Fot%C3%B3trofo.html#:~:text=Fot%C3%B3trofo%20es%20todo%20organismo%20que%20obtiene%20su,realizan%20la%20fotos%C3%ADntesis%20lo%20son%20por%20definici%C3%B3n..>
- [71] F. H. Recio del Bosque, Química Orgánica, 4th ed., Ciudad de México: McGraw-Hill, 2013.
- [72] Secretaría de Energía, "¿Qué son los hidrocarburos?," Gobierno de México, 2023. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/sener/articulos/que-son-los-hidrocarburos#:~:text=Los%20Hidrocarburos%20son%20un%20grupo,todos%20los%20dem%C3%A1s%20compuestos%20org%C3%A1nicos..> [Accessed 10 April 2025].
- [73] NAL Thesaurus Staff, "cultivo," Tesauro Agrícola (NAL Agricultural Thesaurus), Servicio de Investigación Agrícola del USDA, 2019. [Online]. Available: <https://lod.nal.usda.gov/nalt-core/es/page/?uri=https%3A%2F%2Flod.nal.usda.gov%2Fnalt%2F837#:~:text=T%C3%A9rmino%20colectivo%20para%20referirse%20a,o%20pat%C3%B3genos%20transferidos%20por%20cultivo..> [Accessed 7 May 2025].
- [74] Quimica.es, "Monofilético," Enciclopedia Química, 2024. [Online]. Available: https://www.quimica.es/enciclopedia/Monofil%C3%A9tico.html#google_vignette. [Accessed 2 April 2025].
- [75] Instituto Nacional del Cáncer, "Núcleo," Diccionario de cáncer del NCI, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/nucleo>. [Accessed 10 April 2025].
- [76] M. Megías, "El nucléolo," La Célula. Biología celular y molecular, Universidad de Vigo, 2026. [Online]. Available: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/4-nucleolo.php>. [Accessed 10 April 2025].
- [77] Iberdrola, "Clasificación de los reinos biológicos de los seres vivos," Iberdrola, 1 October 2024. [Online]. Available: <https://www.iberdrola.com/sostenibilidad/clasificacion-reinos-biologicos-seres-vivos>. [Accessed 2 April 2025].
- [78] Quimica.es, "Síntesis química," Enciclopedia Química, 2024. [Online]. Available: https://www.quimica.es/enciclopedia/S%C3%ADntesis_qu%C3%ADmica.html. [Accessed 9 April 2025].

- [79] R. Paschotta, "Radiant flux," RP Photonics Encyclopedia , [Online]. Available: https://www.rp-photonics.com/radiant_flux.html. [Accessed 19 July 2025].
- [80] W. J. Smith, Modern Optical Engineering, 3rd ed., McGraw-Hill, 2000.
- [81] Elsevier, "Attenuation length," ScienceDirect Topics, [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/attenuation-length>. [Accessed 8 July 2025].
- [82] J. Heptinstall and R. Rapley, "The Nucleic Acid Protocols Handbook", Totowa: Humana Press, 2000, pp. 57-60.