

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA**

**EVALUACIÓN Y DESARROLLO DE LOS ALGORITMOS DE
PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES EN LA DETERMINACIÓN
DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA DE LAS MICROALGAS
CHLORELLA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIOINGENIERÍA
Sub-línea: Procesamiento Digital de Imágenes**

**TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
ELECTRÓNICO.**

**ALDEMAR JOSÉ CORTES BOHÓRQUEZ
ajosecortes@unicesar.edu.co
LUIS ALFREDO VERDECÍA AMARIS
lalfredoverdecia@unicesar.edu.co**

**PROFESOR
ING. YEZID ALMANZA PEREZ
yezidalmanza@unicesar.edu.co**

VALLEDUPAR – CESAR, 2024

DEDICATORIA

A mi madre que durante todo este tiempo a su lado me ha dado lo mejor de ella, inculcándome buenos valores, hábitos y sentimientos, que a pesar de sacarle canas siempre ha creído en mí y es mi luz más grande en mi vida.

A mi padre por ser ese guía de vida que me ha dejado experimentar muchas cosas y a pesar de equivocarme en tantas, siempre tiene un consejo que darme para ser mejor cada día.

A mis hermanos por siempre darme su apoyo, alegrías, y demás, gracias por ser una inspiración para poder alcanzar mis objetivos, los amo mucho.

Le dedico este triunfo a ellos.

Luis Alfredo Verdecía Amaris

Esta monografía es dedicada a mis padres Aldemar Cortés y Ma. Eugenia Bohórquez, que con su amor, esfuerzo y dedicación me apoyaron a lo largo de todo este camino y fueron ellos mi estímulo para culminar con éxito esta etapa de mi vida.

Aldemar José Cortes Bohórquez

AGRADECIMIENTOS

Agradecerle a Dios por su guía y fortaleza para culminar esta etapa de mi vida, a mis amigos Luis David, Jhon y Oscar, por ser un gran apoyo emocional e intelectual, al Ingeniero Yezid Almanza por ser un guía y apoyo en todo este proceso, darles gracias a todas esas personas que me aportaron un granito de arena para la realización de este trabajo.

Luis Alfredo Verdecía Amaris

Quiero agradecer ante todo a Dios, por la vida, la salud y la fuerza para este proyecto, que sin él nada de esto sería posible, agradezco a nuestro director de trabajo de grado Yezid Almanza, maestros, colegas, familia y amigos que de una forma u otra ayudaron a completar este objetivo. También le agradezco a mi esposa Rosa Angarita, que de una manera especial y cariñosa me ha dado fuerza y coraje, apoyando mis momentos difíciles y por último y no menos importante, agradecer a mi compañero y amigo Luis Verdecía, por su paciencia y apoyo a lo largo de esta carrera y la vida.

Aldemar José Cortes Bohórquez

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	9
1. TÍTULO	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	13
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	14
5. METODOLOGÍA	16
5.1. Tipo de investigación.....	16
5.2. Diseño de investigación	16
5.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	16
5.4. Análisis de los datos.....	17
6. CUERPO DEL TRABAJO	18
6.1. Marco contextual.....	18
6.1.1. Micro algas <i>Chlorella</i>	18
6.2. Antecedentes	18
6.2.1. A nivel mundial	19
6.2.2. En Suramérica	19
6.2.3. En Colombia	20
6.3. Bases teóricas.....	21
6.3.1. Procesamiento De Imágenes (PDI)	21
6.3.2. Principios Básicos y fundamentos del tratamiento digital de imágenes.....	23
6.3.3. Identificación de bordes	28

6.3.4.	Algoritmos para el procesamiento digital de señales.....	28
6.3.5.	Aplicaciones prácticas del procesamiento digital de imágenes en diversas áreas, como la medicina, la agricultura, la industria.	31
6.3.6.	Microalgas	32
6.3.7.	Aplicaciones de la microalga <i>Chlorella</i>	34
6.3.8.	Métodos tradicionales para la determinación de biomasa de microalgas.....	35
6.4.	Resultados	36
6.4.1.	Condiciones de cultivo microalgas.....	36
6.4.2.	Biorreactores	45
6.4.3.	Casos de estudio	48
6.4.4.	Algoritmos de procesamiento digital de imágenes en la determinación de concentración de biomasa en microalgas	60
6.4.5.	Inferencia de la eficacia que presenta el uso de los algoritmos de procesamiento digital de imágenes digitales en la determinación de biomasa de las microalgas <i>Chlorella</i>	69
7.	CONCLUSIÓN	72
8.	REFERENCIAS.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación principal de algas	33
Tabla 2. Valores de prueba para PH y Nitrógeno.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de una imagen con el uso de una matriz.....	23
Figura 2. Ejemplo de Histograma	24
Figura 3. imágenes con cambio de nivel	25
Figura 4. Escala de grises	25
Figura 5. Ejemplo de imagen Binarizada.....	26
Figura 6. Ejemplo de negativo de una imagen	27
Figura 7. Ejemplo de imagen saturada.....	27
Figura 8. Detección de bordes en una imagen.....	28
Figura 9. Filtro suavizado	29
Figura 10. Ejemplo de filtro de realce laplaciano.....	30
Figura 11. Filtro de nitidez.....	30
Figura 12. Parámetros de cultivo.....	37
Figura 13. intensidad de luz vs fotosíntesis.....	38
Figura 14. Afectación del crecimiento de microalgas respecto a la temperatura... 40	
Figura 15. Gráfico de crecimiento de microalgas con y sin agitación	43
Figura 16. Ejemplo de Reactor Abierto	46
Figura 17. Sistema de cultivo raceway.....	47
Figura 18. Metodología de trabajo en laboratorio (MAGYA)	51
Figura 19. Estructura de contención de madera con iluminación artificial	52
Figura 20. Estructura de contención mayor.....	52
Figura 21. Resultados obtenidos al inicio de la implementación	53
Figura 22. Curva de crecimiento de distintas condiciones de PH y Nitrógeno	56
Figura 23. Muestra de ensayo de microalgas Chlorella	61
Figura 24. Código para la aplicación de Umbralización en una imagen de muestra	62
Figura 25. Resultado de Umbralización a distintas intensidades	63
Figura 26. Código para la segmentación por crecimiento de regiones.....	64
Figura 27. Resultado de segmentación por crecimiento de regiones a distintos rangos	65

Figura 28. Ejemplo de algoritmo de detección de contornos.....	66
Figura 29. Ejemplo de Segmentación de contornos.....	67
Figura 30. sistema de funcionamiento de DIGITALGAE	68
Figura 31. Bancos de muestras de algas Microalgas	70

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>Abreviatura/Símbolo</i>	<i>Termino</i>
<i>CB</i>	Concentración de biomasa
<i>CV</i>	Cultivo de microalgas
<i>PDI</i>	Procesamiento Digital de Imágenes
<i>IA</i>	Inteligencia Artificial
<i>RD</i>	Segmentación por Crecimiento de Regiones.
<i>UM</i>	Umbralización
<i>PM</i>	Pigmentos Microalgales
<i>IM</i>	Imagen Microscopical

1. TÍTULO

EVALUACIÓN Y DESARROLLO DE LOS ALGORITMOS DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES EN LA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA DE LAS MICROALGAS CHLORELLA

2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo monográfico realiza una revisión documental sobre el procesamiento digital de imágenes para determinar la concentración de biomasa que existe en una muestra de las microalgas *Chlorella*, teniendo en cuenta antecedentes de estudios, bases teóricas y conceptuales sobre la unidad temática presentada, dicha revisión va direccionada a la utilidad que ofrece la implementación de los algoritmos de procesamiento digital de imágenes en brindar soporte para procesos de laboratorio como lo es la concentración de biomasa.

De este modo, esta información se fundamenta en la compilación de datos relevantes, hallados en diferentes fuentes bibliográficas, brindando un panorama propicio para la comprensión e interpretación del eje temático propuesto, lo que permitirá fijar una postura que respalda el argumento que motivó a los investigadores a la realización de la indagación.

Con respecto, al procesamiento digital de imágenes en la actualidad es una disciplina ampliamente utilizada por diversos campos, su impacto no solo se ve involucrado en el ámbito tecnológico, también influye en las áreas científicas por mencionar algunas. Por lo tanto, es un área dentro de la ingeniería que emplea la información comprendida en una imagen digital, y por medio de un procesador y un conjunto de técnicas que comprenden operaciones y cuyo resultado final es la imagen procesada, se pueden lograr un sin número de objetivos, como podría ser la mejora de la calidad de la imagen. En pocas palabras, el procesamiento digital de imágenes consiste en alterar la información visual para obtener mejores resultados o para aislar algunas características particulares en ella [1].

El desarrollo de un algoritmo, el cual presenta los resultados a partir de una fotografía con parámetros establecidos de intensidad lumínica y distancia, además de descomponer la imagen en sus componentes principales de color (RGB, HSB, CMYK, Escala de Grises, saturación de color, entre otros), arroja parámetros cuantitativos reales y con un margen de error significativo, a diferencia de los parámetros recolectados manualmente [2].

Es necesario recalcar que, al manejar una herramienta tecnológica como el procesamiento digital de imágenes, con base en los estudios a la hora de determinar la concentración de biomasa se reduce el tiempo que emplean los investigadores con el método gravimétrico, el cual es uno de los métodos analíticos más utilizados en el desarrollo de las investigaciones, este consiste en la toma de una muestra, la cual es pesada inicialmente, centrifugada, secada y por último pesada, esto con la finalidad de saber la cantidad de biomasa que contiene la muestra extraída. A pesar de ser un método simple, toma alrededor de 24 horas el proceso para obtener el peso seco.

Para el crecimiento y desarrollo de la microalga (*Chlorella*) a nivel de laboratorio, se utilizan luces halógenas de forma constante en intervalos de 16:8 horas y una temperatura de 22 ± 3 °C en el recinto, empleando métodos para cuantificar su densidad celular, tales como el hematocitometro neubauer, microscopía óptica y espectrofotometría, los cuales conllevan un tiempo mucho mayor sobre todo para grandes números de muestras [3].

En síntesis, esta revisión bibliográfica en la primera parte describe brevemente las temáticas a tratar, los objetivos a tener en cuenta durante toda la investigación y qué motivó a los investigadores; luego se observará las bases teóricas para la contextualización de los temas y por último se encuentran razones significativas que llevan a visualizar de forma directa los hallazgos de esta revisión monográfica, después de todo se espera que futuros investigadores se motiven a indagar y emplear el procesamiento de imágenes.

3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

3.1. Objetivo general

- ✓ Realizar un estudio de la aplicación del procesamiento digital de imágenes como herramienta para el monitoreo continuo y en tiempo real de la concentración de biomasa en cultivos de microalgas *Chlorella*.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Describir las bases teóricas y aportes notables del procesamiento digital de imágenes aplicado para la determinación de la biomasa de manera indirecta en la microalga *Chlorella*.
- ✓ Determinar la influencia de las condiciones de cultivo, como la temperatura, la concentración de nutrientes y la iluminación, en la concentración de biomasa de las microalgas *Chlorella*.
- ✓ Realizar una síntesis acerca de la eficacia que presenta el uso de los algoritmos de procesamiento digital de imágenes digitales en la determinación de biomasa de las microalgas *Chlorella*.

4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Es conveniente referir que la biomasa microalgal, se suele determinar a través de métodos directos, como por ejemplo el método gravimétrico, la cual es considerada una de las técnicas más empleados, debido a los tiempos que toma la aplicación de dicha técnica para a determinación total de biomasa presente en una muestra en términos de peso seco por unidad de volumen

La determinación de la concentración de biomasa en las microalgas *Chlorella* es de suma importancia en diversos campos, tales como, la producción de biocombustibles, alimentos y productos farmacéuticos. De manera tradicional, la biomasa se determina llevando a cabo procedimientos físicos y químicos, los cuales pueden llegar a ser destructivo para la microalga y conlleva largos tiempos de implementación, con los cuales, los investigadores en ocasiones no cuentan. Sin embargo, el empleo del procesamiento digital de imágenes ha surgido como una alternativa para medir esta concentración, aplicando periodos de tiempo más cortos y adicionalmente reduciendo el número de pasos y equipos para su medición.

De igual importancia, el procesamiento digital de imágenes dedicado a la adquisición de imágenes de microalgas, concede un estudio con base a imágenes microscópicas donde se aprecian sus características visuales, como tamaño, forma y color, ya que incluye no solo los microorganismos activos, sino, microorganismos muertos, materia inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica absorbida como lo plantea el autor; existen otros proyectos y estudios basados en apoyos tecnológicos como lo es el procesamiento digital de imágenes [6], los cuales, permiten determinar el índice de biomasa microalgal a partir de una muestra extraída de un cultivo, por medio de una fotografía captada en una caja con iluminación controlada. Un ejemplo de estos estudios es “MICROALGAE BIOMASS QUANTIFICATION BY DIGITAL IMAGE PROCESSING AND RGB COLOR ANALYSIS” donde hace uso del procesamiento digital de imágenes, aplica un

análisis de color RGB (Red – Blue - Green) para medir la concentración celular en tres microalgas diferentes (*Chlorella Vulgaris*, *Botryococcus Braunii* y *Ettlia sp.*). A través de algoritmos de procesamiento de imágenes, es posible extraer información cuantitativa sobre la densidad celular y, por lo tanto, la concentración de biomasa en las microalgas. Por lo que, la presente investigación pretende mostrarse como una alternativa para la obtención de la concentración de biomasa, resaltando las ventajas que ofrece el procesamiento digital de imágenes como un instrumento tanto en la enseñanza, como en el aprendizaje, por su comodidad en la forma de implementación y en los tiempos de ejecución; por ende, emplear el procesamiento de imágenes digitales permitirá reducir los tiempos que se requieren en los focos de estudio y la obtención de resultados, gracias a la aplicación de técnicas avanzadas de procesamiento del color y el ajuste de los parámetros que facilitan la sensibilidad del sistema; en fin, es un alternativa que le dará al docente como al estudiante verificar con antelación y en menor tiempo que le tomaría por el método tradicional, alcanzando resultados favorables como los que se esperan en comparación con el método gravimétrico.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de investigación

Esta investigación se clasifica como una revisión documental, lo que implica una recopilación y análisis de información existente sobre el procesamiento digital de imágenes aplicado a la determinación de la concentración de biomasa en microalgas *Chlorella*. Se basa en antecedentes de estudios y bases teóricas.

5.2. Diseño de investigación

El diseño de investigación en este caso se caracteriza por ser descriptivo, ya que se busca describir y analizar las bases teóricas y prácticas del procesamiento digital de imágenes aplicado a la determinación de la concentración de biomasa en microalgas *Chlorella*. Este enfoque implica recopilar información relevante de diversas fuentes bibliográficas y sintetizarla para proporcionar una comprensión completa de la temática tratada.

Por lo tanto, el diseño de investigación de esta monografía se centra en recopilar, analizar y sintetizar información relevante sobre el procesamiento digital de imágenes y su aplicación en la determinación de biomasa en microalgas *Chlorella*, con el fin de proporcionar una visión completa y fundamentada de esta área de estudio.

5.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La principal técnica de recolección de datos es la revisión bibliográfica, mediante la cual se compilan datos relevantes de diversas fuentes. No se menciona un instrumento específico de recolección de datos, ya que la información se obtiene de fuentes bibliográficas. Además de complementar con la implementación que se intentó realizar por los investigadores en el laboratorio de Microbiología, Agrícola Y Ambiental (MAGYA) de la Universidad Popular del Cesar.

5.4. Análisis de los datos

Los objetivos se desarrollaron de la siguiente manera:

- Para dar respuesta al primer objetivo específico que consistió en investigar consiguiendo así fundamentación teórica que permitió determinar cuál es la influencia de la Biomasa en la microalga *Chorella*, recopilando la información y exponiéndola en el presente documento.
- Para el segundo objetivo, se llevó a cabo un acompañamiento sobre un cultivo de algas que desarrollaba un estudiante de Maestría del programa de Ingeniería Agroindustrial, para así determinar la influencia de los factores ambientales, como lo son la temperatura, iluminación, concentración de nutrientes, llegando a resultados que serán expuestos de manera futura en el presente documento.

6. CUERPO DEL TRABAJO

6.1. Marco contextual

6.1.1. Micro algas *Chlorella*

Las microalgas *Chlorella* tienen una amplia gama de usos y aplicaciones en diversos campos. Son ricas en proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes, lo que las hace populares como suplementos dietéticos. Se utilizan comúnmente en forma de tabletas, polvo o extractos líquidos para mejorar la nutrición y promover la salud. También se incorporan en productos alimenticios como barras energéticas, batidos, bebidas y alimentos horneados debido a su alto contenido nutricional y propiedades beneficiosas para la salud. Además, las microalgas *Chlorella* son objeto de investigación para la producción de biocombustibles, como biodiesel y bioetanol, como alternativa sostenible a los combustibles fósiles debido a su rápida tasa de crecimiento y alto contenido de lípidos. También pueden utilizarse en el tratamiento de aguas residuales para eliminar contaminantes, como nutrientes excesivos y metales pesados, a través de procesos de biofiltración y fitorremediación.

Los extractos de microalgas *Chlorella* se utilizan en la industria cosmética para formular productos para el cuidado de la piel y el cabello debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Además, son objeto de estudio en la investigación científica debido a su capacidad para crecer en diferentes condiciones ambientales y su versatilidad en aplicaciones biotecnológicas, lo que las convierte en un modelo útil para estudios en biología, ecología y bioquímica.

6.2. Antecedentes

A lo largo del tiempo, la humanidad ha dedicado esfuerzos significativos para comprender y aprovechar los recursos naturales en pos del desarrollo. Entre estos recursos, las microalgas, específicamente la *Chlorella*, han emergido como objeto de interés en investigaciones y proyectos de ingeniería aplicada. Hoy en día, estas microalgas representan una fuente de gran potencial en diversas aplicaciones

industriales y domésticas, gracias a su capacidad para proporcionar una amplia gama de beneficios. En este contexto, se han realizado estudios a nivel global, en Suramérica y en Colombia, que resaltan la importancia del trabajo realizado en relación con las microalgas *Chlorella*.

6.2.1. A nivel mundial

En el trabajo realizado en España, titulado *herramienta grafica para la caracterización de cultivos de microalgas basada en redes neuronales artificiales*, de Pablo Otalora, Jose Luis Guzman del Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Coruña, en él se aborda el problema de caracterización de muestras de microalgas mediante modelos de redes neuronales artificiales. Se presenta una interfaz gráfica combinada con los modelos que permite predecir la composición de las especies *Chlorella Vulgaris* y *Scenedesmus Almeriensis* a partir de datos relativos a la muestra, como pueden ser imágenes de las células o propiedades descriptivas de estas. Los resultados del trabajo proporcionan una herramienta completa para abordar el problema sin necesidad de conocimientos del lenguaje de programación, de forma rápida, sencilla e intuitiva. [4]

6.2.2. En Suramérica

En el trabajo de Bonilla, S., & O'farrell, I. *La importancia de usar el biovolumen en estudios de fitoplancton y monitoreo ambiental de cianobacterias* del año 2023, se tiene estudios específicos sobre la biomasa del fitoplancton es una variable que se usa en estudios de ecología y en monitoreos de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas. El bioindicador de la biomasa puede ser desde general e indirecto, como la concentración de la clorofila a, a específico y cuasi-directo, como el biovolumen. Basadas en búsquedas bibliográficas y en los resultados de una encuesta dirigida a científicos y técnicos de América Latina, se discutió la importancia de usar el biovolumen como la variable más apropiada para estimar la biomasa, el costo que tiene cuantificar el fitoplancton utilizando diferentes unidades de recuento y las implicancias en la interpretación de los resultados. Las unidades

de cuantificación utilizadas para reportar el fitoplancton fueron el individuo, la célula y el biovolumen. El individuo representa la unidad biológica natural del organismo (células, cenobios, colonias o filamentos) y varía ampliamente en tamaño. Por lo tanto, el fitoplancton reportado en individuos por unidad de volumen puede llevar a errores de interpretación conceptuales, de los cuales el más grave es subestimar la biomasa de las floraciones. Las células tienen grandes variaciones en su tamaño, por lo que su abundancia puede correlacionarse pobremente con el biovolumen o con la concentración de la clorofila a. El autor recomienda usar el biovolumen como indicador de biomasa para el fitoplancton en general, y de forma imperativa para el monitoreo de cianobacterias [5].

6.2.3. En Colombia

En el trabajo titulado *Evaluación del crecimiento de la microalga Chlorella Sorokiniana en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas*, explican que el alga *Chlorella Sorokiniana* es una microalga con alto potencial biotecnológico por su capacidad de sintetizar ácidos grasos de interés industrial, rápido crecimiento y capacidad de adaptación a diferentes fuentes de nutrientes tanto en regímenes autotróficos como mixotróficos e inclusive heterotróficos. Su finalidad fue identificar el medio de cultivo que permitiera un máximo crecimiento de *C. Sorokiniana* para su producción masiva. Se evaluaron los medios de cultivo Sueoka, Guillard y Remital, que ofrecen nutrientes en condiciones autotróficas y lixiviada de gallinaza, en régimen mixotrófico. Se registró una densidad celular máxima en medio Remital de $86,5 \pm 0,75 \times 10^7$ células/ml y una velocidad específica de crecimiento media de 0,3 generaciones/ día. Los test estadísticos de Tukey y Fisher indicaron que el Remital fue el mejor medio de cultivo y las condiciones autotróficas fueron ideales para el crecimiento de *C. Sorokiniana*. El uso de altas concentraciones de Remital no mejoró significativamente el crecimiento de la microalga. Por tanto, se recomienda el uso de Remital en bajas concentraciones (1g/L) como la mejor opción para la producción masiva de biomasa de *C. Sorokiniana* [6].

En el artículo *propagación de la microalga Chlorella sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular* de Cherlys Infante, se estudia el crecimiento de *Chlorella sp.*, un alga microscópica, ampliamente distribuida en aguas marinas, con el fin de observar su comportamiento en cultivo por lote. El diseño experimental contempló la obtención de la biomasa de la microalga, utilizando un medio preparado con sales inorgánicas. Se obtuvo información acerca de la reproducibilidad de los ensayos realizados, estableciendo que se trata de un microorganismo de fácil propagación. Este resultado a su vez posibilita la aplicación de la microalga a diferentes estrategias para la remoción de sustancias nocivas presentes en los ecosistemas. El cultivo por lotes resulta adecuado para la obtención de biomasa de *Chlorella sp* observándose un ajuste lineal para la cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos son una contribución al proyecto de investigación en el área de biosorción, que actualmente se desarrolla en conjunto la Universidad de Cartagena y la Universidad del Atlántico (Colombia) [7].

6.3. Bases teóricas

6.3.1. Procesamiento De Imágenes (PDI)

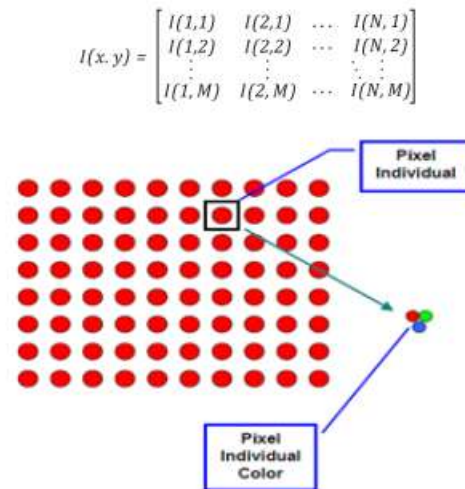
El Procesamiento Digital de Imágenes se puede definir como el manejo de imágenes mediante el uso de computadoras. Las operaciones realizadas en este proceso son similares a las discutidas anteriormente en la sección correspondiente. Sin embargo, una distinción crucial entre el procesamiento de imágenes y la visión es que las imágenes en el primero no se limitan a aquellas capturadas en el espectro visible, como lo hace el sistema de visión biológica. En cambio, estas imágenes pueden provenir de cualquier región del espectro electromagnético. Actualmente, existen sistemas de procesamiento de imágenes que operan con imágenes obtenidas mediante el escaneo de rayos X, rayos gamma, resonancia magnética, microondas [8].

El interés en el Procesamiento Digital de Imágenes se fundamenta principalmente en dos áreas de aplicación:

- Mejorar la calidad de la información visual para su comprensión por parte de los humanos.
- Procesar los datos de la imagen para su almacenamiento, transmisión y análisis por sistemas automáticos o autónomos.

Las imágenes son la materia prima tanto del procesamiento de imágenes como de la visión. Estas imágenes se consideran representaciones del mundo físico y contienen información vital, que se captura mediante un proceso de muestreo, generalmente mediante medios electrónicos. Para obtener imágenes digitales, se requiere un proceso que incluye la captura, el muestreo, la cuantificación y la codificación. Una imagen puede definirse como una función bidimensional que describe la intensidad de la luz (comúnmente en el espectro visible). Usualmente, se representa una imagen como $f(x,y)$, donde el valor de la función representa la intensidad obtenida mediante la indexación de las coordenadas x e y . La representación más común de una imagen es a través de una matriz, como se puede apreciar en la Figura 1.

Figura 1. Representación de una imagen con el uso de una matriz



Benemérita Universidad autónoma de Puebla. Representación de una imagen en forma matricial. Consultado el 26 de febrero de 2024 en https://www.cs.buap.mx/~hilario_sm/slide/PDI/unidad%20III.pdf

6.3.2. Principios Básicos y fundamentos del tratamiento digital de imágenes

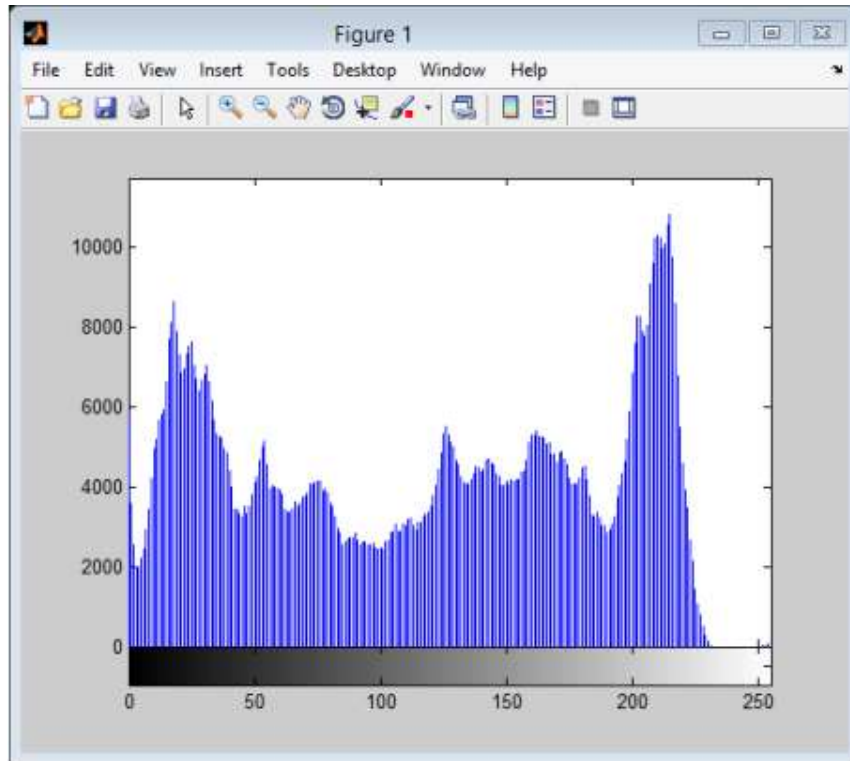
Hoy en día, el procesamiento digital de imágenes mediante diversas técnicas se emplea en diferentes campos de investigación, no limitándose simplemente a la mejora de la calidad visual o la aplicación de efectos en una imagen. Este proceso posibilita la exploración, manipulación, análisis y comprensión de datos o estadísticas relevantes. A continuación, se describirán algunas de las técnicas fundamentales utilizadas en el tratamiento digital de imágenes.

Histograma

Se trata de un gráfico de barras o niveles que representa un conjunto de datos, mostrando la dirección, variación, acumulación o dispersión de una variable cuantitativa o numérica. En el contexto de las imágenes, este tipo de gráfico revela los niveles de intensidad de color presentes, así como el rango de valores más y menos frecuentes. Como es ilustrado en la Figura 2, se muestra el histograma de una imagen en escala de grises, donde las coordenadas (X, Y) representan

respectivamente la superficie horizontal que indica el valor del color, y la superficie vertical que refleja la frecuencia de su aparición [8].

Figura 2. Ejemplo de Histograma



Fuente: los Autores

Cambio de niveles de iluminación

Esta estrategia se fundamenta en la alteración de la iluminación, como se aprecia en la Figura 3, donde se evidencia un cambio tanto positivo como negativo. Este cambio afecta la apariencia de la imagen, haciéndola más luminosa o más oscura, lo que resulta en la creación de un contraste visual. El contraste de una imagen puede ser mejorado mediante el ajuste de la intensidad de cada píxel individualmente o de la matriz en su totalidad.

Figura 3. imágenes con cambio de nivel



Fuente: los Autores

Conversión Escala de Grises

Esta metodología implica la conversión de los colores del modelo RGB a tonos de gris. Se determina el valor de cada píxel según la intensidad del color, lo que resulta en una escala de tonalidades grises. Los colores representados incluyen blanco, gris y negro, tal como se exhibe en la muestra.

Figura 4. Escala de grises



Fuente: Los autores.

Binarización

Una imagen binaria se compone únicamente de dos valores en sus píxeles: cero y uno. El valor cero representa el color negro, mientras que el uno representa el color blanco, tal como se ilustra en la Figura 5.

Se trata de una técnica que implica recorrer la matriz de la imagen digital mediante bucles o recursividad, con el propósito de reducir la escala de grises a únicamente dos valores: negro (0) y blanco (255), es decir, un sistema binario que indica la ausencia o presencia de color, respectivamente. Cada píxel de la imagen se compara con un umbral de sensibilidad (valor $T = \text{Threshold}$). Por ejemplo, aquellos valores que superen el umbral se asignan como blanco (255), mientras que los inferiores se asignan como negro (0).

Este tipo de imágenes ocupa ocho veces menos espacio que una imagen en escala de grises, y se utiliza ampliamente en reproducción de imágenes, visión artificial, segmentación y reconocimiento de caracteres.

Figura 5. Ejemplo de imagen Binarizada



Fuente: Los autores.

Negativo

Esta técnica se apoya en la identificación del color contrario al utilizado en el modelo de color de la imagen original. Durante este proceso, se modifica cada píxel de manera individual, sin considerar su contexto inmediato, es decir, sin tener en

cuenta la relación con otros píxeles cercanos. Como consecuencia, se produce una inversión en las tonalidades identificadas, generando un efecto análogo al proceso de revelado de una película fotográfica tradicional, tal como se exhibe en la Figura 6.

Figura 6. Ejemplo de negativo de una imagen



Fuente: Los autores.

Saturación

La saturación representa la intensidad relativa o pureza del modelo de color RGB, CMY o HSI. Otra característica del color es su valor, denominado esplendor, que se refiere a la combinación de luz, determinando el grado de claridad u oscuridad de un color. Este valor también se ve afectado por la mezcla de pigmentos, los cuales pueden ser alterados mediante la adición de colores como blanco y negro, como se ilustra en la figura.

Figura 7. Ejemplo de imagen saturada



Fuente: Los autores.

6.3.3. Identificación de bordes

Este método se fundamenta en la identificación de objetos a través de la extracción del contorno de la figura, destacando los bordes presentes en la imagen y mostrando lo que ha sido reconocido, como se puede apreciar en la Figura 8. En la actualidad, esta técnica de procesamiento resulta beneficiosa para la detección de descubrimientos arqueológicos y su aplicación en sistemas de inteligencia artificial de robots.

Figura 8. Detección de bordes en una imagen



Datasmarts, Detección de bordes de una imagen usando el método de canny Consultado el 28 de febrero de 2024 en <https://www.datasmarts.net/lo-que-necesitas-saber-sobre-la-deteccion-de-bordes/>

6.3.4. Algoritmos para el procesamiento digital de señales

En el procesamiento digital de imágenes, se utilizan diversas técnicas y algoritmos para manipular y mejorar la calidad de las imágenes. Algunos de los más comunes incluyen:

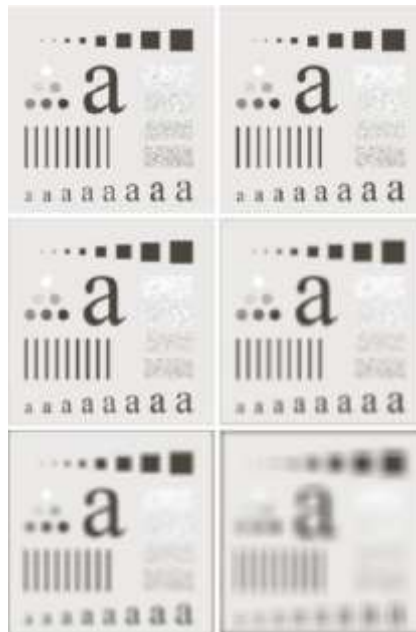
El filtrado espacial

Es una técnica fundamental en el procesamiento digital de imágenes que implica la aplicación de máscaras o kernels a la imagen original. Estas máscaras son matrices de números que se desplazan sobre la imagen y se utilizan para realizar operaciones locales en cada píxel. El propósito del filtrado espacial es resaltar ciertas características de la imagen, como bordes o texturas, suavizar el ruido o mejorar la calidad de la imagen en general.

Existen diferentes tipos de filtros espaciales, cada uno con su propia función y efecto en la imagen:

- **Filtro de suavizado:** Se utiliza para eliminar el ruido de la imagen y suavizar las transiciones abruptas de intensidad. Esto se logra mediante la aplicación de un promedio ponderado de los valores de intensidad de los píxeles vecinos, distintas intensidades de este filtro se pueden comprender visualizando la Figura 9 .

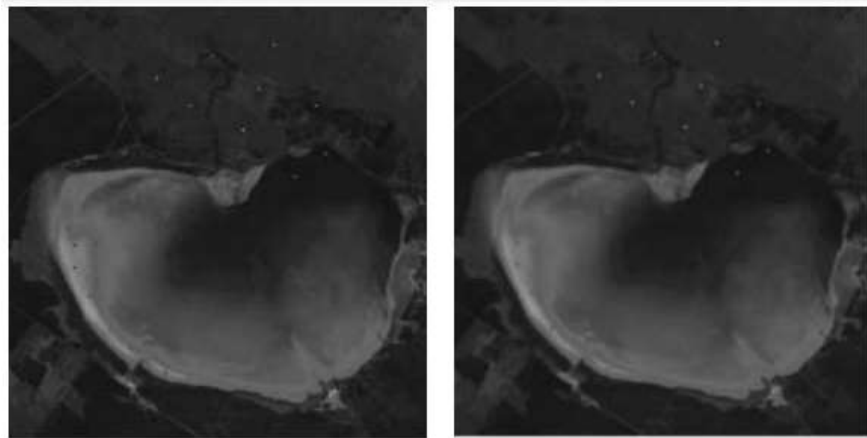
Figura 9. Filtro suavizado



cse.sc.edu, imagen con distintos niveles de filtro suavizado consultado el 28 de febrero de 2024 en <https://cse.sc.edu/~tongy/csce763/lectures/lect11.pdf>

- **Filtro de realce de bordes:** Diseñado para resaltar los bordes en la imagen, destacando las discontinuidades significativas en la intensidad de los píxeles. Esto se logra mediante la detección de cambios bruscos en la intensidad y resaltando estas transiciones.

Figura 10. Ejemplo de filtro de realce laplaciano



bibliotecacpa, ejemplo del uso de filtro de realce laplaciano consultado el 28 de febrero de 2024 en <http://www.bibliotecacpa.org.ar/greenstone/collect/salagr/index/assoc/HASH92ec.dir/doc.pdf>

- **Filtro de nitidez:** Utilizado para mejorar la nitidez de la imagen, realzando los detalles y aumentando el contraste local. Esto se logra resaltando las diferencias de intensidad entre píxeles vecinos.

Figura 11. Filtro de nitidez



Fuente: los Autores

6.3.5. Aplicaciones prácticas del procesamiento digital de imágenes en diversas áreas, como la medicina, la agricultura, la industria.

El procesamiento digital de imágenes tiene una amplia gama de aplicaciones prácticas en diversas áreas, algunas de las cuales incluyen:

- **Medicina:** en este campo es empleado para el diagnóstico médico, la planificación de tratamientos y la investigación científica. Por ejemplo, en radiología, se utilizan imágenes médicas digitales para identificar anomalías en tejidos y órganos. Además, en cirugía asistida por computadora, se utilizan imágenes para guiar procedimientos quirúrgicos de manera precisa.
- **Agricultura:** el procesamiento de imágenes se utiliza para monitorear el crecimiento de los cultivos, detectar enfermedades de las plantas, optimizar el uso de pesticidas y fertilizantes, y predecir rendimientos de cosechas. Las imágenes de satélite y los drones también se utilizan para el mapeo y la vigilancia de terrenos agrícolas.
- **Industria:** sus aplicaciones son en el control de calidad de productos manufacturados, inspección de piezas, seguimiento de procesos de fabricación y detección de defectos en productos. Por ejemplo, en la industria automotriz, se utilizan sistemas de visión por computadora para inspeccionar la calidad de las piezas y ensamblajes.
- **Seguridad y vigilancia:** en este campo se utiliza para la detección de intrusiones, reconocimiento facial, seguimiento de objetos y análisis de comportamiento. Las cámaras de seguridad equipadas con tecnología de procesamiento de imágenes pueden detectar actividades sospechosas y alertar a los operadores de seguridad.

- **Ciencia ambiental:** este se utiliza para monitorear cambios en el medio ambiente, como la deforestación, la erosión del suelo, el derretimiento de glaciares y la contaminación del agua. Las imágenes de satélite proporcionan datos importantes para estudiar y comprender los efectos del cambio climático y la actividad humana en el medio ambiente [9].

6.3.6. Microalgas

En el ámbito de la ficología aplicada y la biotecnología, el término "microalgas" se refiere a organismos microscópicos que poseen clorofila a y realizan fotosíntesis oxigénica, careciendo de diferenciación en raíces, tallos y hojas. Este grupo abarca tanto a microorganismos eucariotas, clasificados tradicionalmente según sus pigmentos fotosintéticos en rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas, como a procariotas, como las cianobacterias y proclorofitas, que se encuentran distribuidos en diversos hábitats terrestres y acuáticos.

Estos microorganismos desempeñaron un papel fundamental en la modificación de la composición de la atmósfera primitiva hace aproximadamente 3500 millones de años, incrementando los niveles de oxígeno y generando una atmósfera rica en este gas, lo que ha posibilitado el desarrollo de la vida como la conocemos actualmente. Además, se estima que son responsables de al menos la mitad de la productividad primaria del planeta [10].

Características generales de las microalgas

Las microalgas constituyen un conjunto diverso de microorganismos fotosintéticos unicelulares, tanto procariontes como eucariontes, que se encuentran en una amplia variedad de hábitats, como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o suelos, y pueden tolerar una amplia gama de condiciones ambientales, como variaciones de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes. Se estima que estas microalgas son responsables de aproximadamente el 50% de la producción de oxígeno y la fijación del 50% del carbono en nuestro planeta. A pesar de su importancia, la biodiversidad

de las microalgas es vasta, con alrededor de 40,000 especies identificadas hasta el momento, aunque se estima que existen más de 100,000. Sin embargo, en muchos casos, la composición bioquímica y el metabolismo de estas especies siguen siendo desconocidos. Las microalgas se clasifican en función de varios parámetros, como su pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular, resumen detallado en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación principal de algas

Clase	Características
<i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir ya sea como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo, pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones. En esta división destaca la clase <i>Prasinophyceae</i> , caracterizada por incluir especies que forman parte del 'pico-plancton'
<i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	Las diatomeas predominan en aguas oceánicas, no obstante, también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares. Almacenan carbono de maneras diversas, ya sea como aceites o como crisolaminarina (polímero glucídico)
<i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	División constituida por una gran diversidad de clases dentro de las cuales destaca la <i>Crysophyceae</i> (algas doradas), conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos. Las algas doradas se distinguen por los complejos pigmentos que las conforman, los cuales les proporcionan tonalidades amarillas, cafés o naranjas. Las especies de este grupo son principalmente de agua dulce. Sus reservas de carbono son los lípidos y los carbohidratos. Asimismo, otras clases relevantes de esta división son: <i>Phaeophyceae</i> (algas cafés), <i>Xantophyceae</i> (algas verde-amarillas), <i>Eustigmatophyceae</i> (forma parte del 'pico-plancton'), entre otras.
Cianobacteria	Las cianobacterias son microorganismos procariotes cuya estructura y organización son similares a las de las bacterias. Las cianobacterias desempeñan un papel relevante en la fijación del nitrógeno atmosférico
Otras divisiones	<i>Rhodophyta</i> (algas rojas), <i>Dinophyta</i> (dinoflagelados)

Upb.edu.co, Microalgas para la industria alimenticia consultado el 1 marzo de 2024 en <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/2306>

6.3.7. Aplicaciones de la microalga *Chlorella*

Las microalgas *Chlorella* poseen una importancia significativa en una variedad de campos debido a sus diversas propiedades y capacidades. Algunas de las áreas en las que las microalgas *Chlorella* son relevantes incluyen:

- **Industria de alimentos y suplementos:** Las microalgas *Chlorella* son una fuente rica en nutrientes, incluyendo proteínas, vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales. Por lo tanto, se utilizan en la producción de alimentos y suplementos nutricionales para humanos y animales.
- **Producción de biocombustibles:** Debido a su alta tasa de crecimiento y capacidad de fotosíntesis eficiente, las microalgas *Chlorella* son una opción prometedora para la producción de biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol. Su cultivo también puede ayudar a reducir las emisiones de carbono y mitigar el cambio climático [11].
- **Medio ambiente y tratamiento de aguas residuales:** Las microalgas *Chlorella* pueden utilizarse en la biorremediación de aguas contaminadas, ya que tienen la capacidad de absorber metales pesados, nutrientes y otros contaminantes del agua. Además, su cultivo puede contribuir a la captura de dióxido de carbono atmosférico, ayudando así a mejorar la calidad del aire.
- **Investigación farmacéutica y médica:** Se ha demostrado que las microalgas *Chlorella* poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y inmunomoduladoras, lo que las hace útiles en la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos y tratamientos para una variedad de enfermedades y condiciones de salud.
- **Agricultura y acuicultura:** El uso de microalgas *Chlorella* como alimento para animales, incluidos peces, crustáceos y aves, es cada vez más común

en la agricultura y la acuicultura. Además, se utilizan en la agricultura como biofertilizantes y bioestimulantes para mejorar el rendimiento de los cultivos y la calidad del suelo [12].

6.3.8. Métodos tradicionales para la determinación de biomasa de microalgas

Los métodos tradicionales para la determinación de biomasa de microalgas son técnicas establecidas que han sido utilizadas durante mucho tiempo en la investigación y la industria. Algunos de estos métodos incluyen:

- **Método gravimétrico:** Este método implica la medición del peso seco de las microalgas. Se toma una muestra de microalgas, se seca y luego se pesa. Este peso se considera una medida de la biomasa de las microalgas presentes en la muestra. Aunque es un método comúnmente utilizado, puede ser lento y laborioso, ya que implica la preparación de muestras y la espera del tiempo de secado.
- **Conteo celular:** En este método, las microalgas se cuentan directamente utilizando técnicas de microscopía. Se puede utilizar un hemocitómetro para contar las células bajo un microscopio. Este método proporciona información sobre la densidad celular de las microalgas en una muestra.
- **Medición de la clorofila:** La clorofila es un pigmento fotosintético presente en las microalgas. Se puede medir la cantidad de clorofila presente en una muestra para estimar la biomasa de las microalgas. Esto se puede hacer utilizando técnicas de espectrofotometría, donde se mide la absorbancia de la clorofila a ciertas longitudes de onda.
- **Volumen y densidad:** Se puede determinar la biomasa de las microalgas midiendo el volumen ocupado por las células en una muestra y calculando

su densidad. Esto se puede hacer mediante técnicas de sedimentación o centrifugación para compactar las células y medir el volumen ocupado.

Estos son solo algunos de los métodos tradicionales utilizados para la determinación de biomasa de microalgas. Cada método tiene sus ventajas y limitaciones, y la elección del método adecuado depende de varios factores, como la precisión requerida, la disponibilidad de equipos y recursos, y el tipo de muestra de microalgas [13].

6.4. Resultados

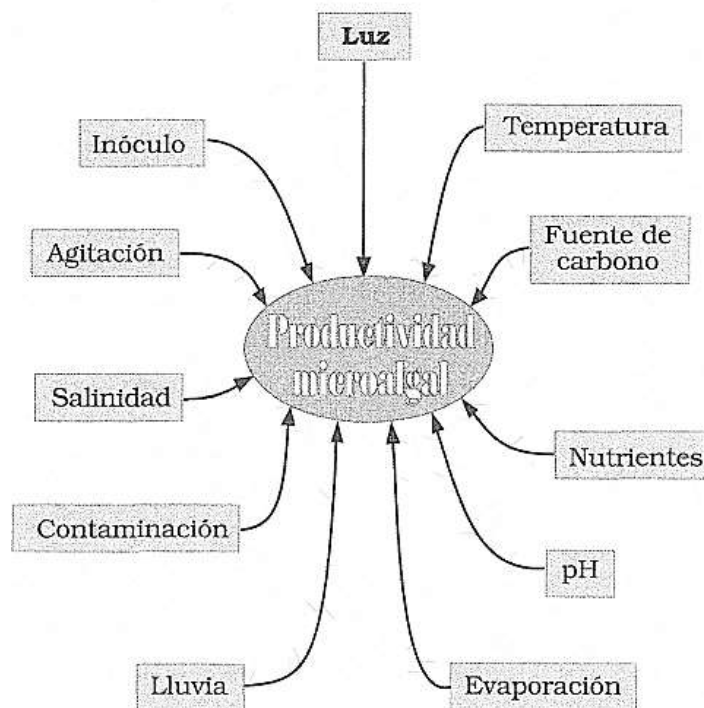
6.4.1. Condiciones de cultivo microalgas

El desarrollo de las microalgas sigue el principio de la ley del mínimo, lo que implica que su crecimiento está limitado por el factor presente en la menor cantidad, que alcanza el umbral crítico necesario para su desarrollo. Inicialmente propuesto por Liebig, el concepto de factor limitante se refería exclusivamente a deficiencias en nutrientes químicos, pero con el tiempo se ha ampliado para incluir aspectos físicos como la luz y la temperatura. Además, se reconoce que los parámetros ambientales pueden limitar el crecimiento tanto por exceso como por déficit. Los organismos también pueden ser considerados limitantes en sistemas naturales si su actividad, como la depredación o la liberación de productos tóxicos, obstaculiza el crecimiento de las microalgas [12].

Es esencial comprender tanto las condiciones óptimas como los límites de tolerancia de las microalgas para cada parámetro ambiental relevante. Sin embargo, estos límites pueden variar cuando otro parámetro experimenta cambios. En entornos naturales, el éxito de una microalga sugiere que es lo suficientemente adaptable en sus necesidades e interacciones. Esta flexibilidad también es deseable en sistemas de cultivo de microalgas.

En el cultivo masivo, el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario: un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones físico químicas (temperatura, pH, etc.) y energía.

Figura 12. Parámetros de cultivo



Escuela politécnica del litoral, Diseño de un Sistema de Iluminación Móvil para un Fotobiorreactor Cerrado de Cultivo de Microalgas consultado el 4 marzo 2024 en <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52806>

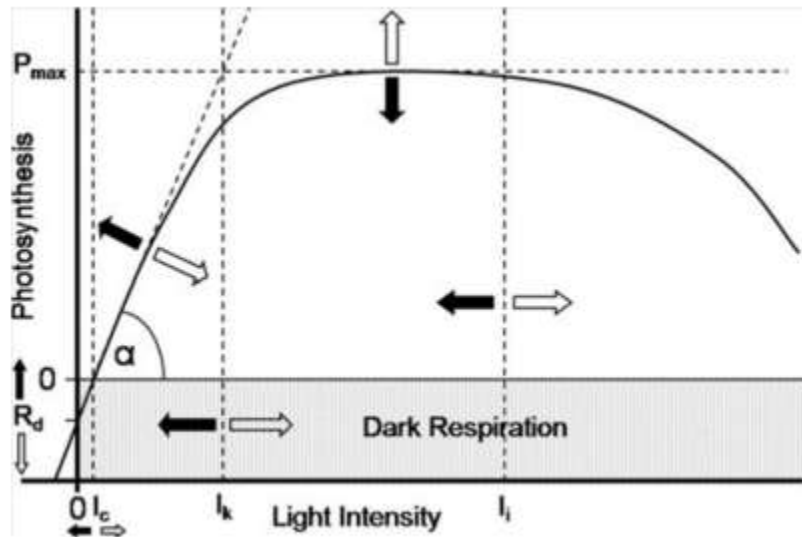
LUZ

La luz desempeña un papel esencial en el cultivo de microalgas, tanto de manera independiente como en su relación con otros factores. La radiación fotosintéticamente utilizable (PAR), que se encuentra en el rango visible del espectro (400 - 700 nm), sirve como la principal fuente de energía para la fotosíntesis. Tanto la intensidad de la luz como la longitud de onda y el fotoperíodo,

que controla varios ritmos circadianos, influyen en el crecimiento y metabolismo de las microalgas.

La evolución de la tasa fotosintética en relación con la intensidad lumínica se representa mediante una curva vista en la Figura 13. El término P_{max} indica el punto de máxima tasa fotosintética, alcanzado cuando hay saturación lumínica, mientras que R_d se refiere al nivel de respiración oscura. El punto en el que la curva de respuesta fotosintética se cruza con el valor de la respiración oscura se denomina punto de compensación; α representa la eficiencia fotosintética. I_k indica el nivel de intensidad a partir del cual se alcanza la saturación, y I_i es el punto de inicio de la inhibición. Las flechas oscuras indican la tendencia de la gráfica en caso de aclimatación a la oscuridad, mientras que las flechas blancas representan la aclimatación a altas intensidades lumínicas.

Figura 13. intensidad de luz vs fotosíntesis



Springer. *Microalgal biomass production: challenges and realities* consultado el 5 de marzo de 2024 en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11120-010-9573-5>

Las fuentes de luz artificial poseen espectros de emisión que no siempre coinciden con la luz solar, y la calidad de la luz puede influir en diversos aspectos como el crecimiento, metabolismo, reproducción y forma de las microalgas. Por lo tanto, es

necesario investigar el espectro óptimo para cada tipo de microalga a cultivar. Las lámparas fluorescentes tubulares son preferidas como fuente de iluminación en cultivos de interior debido a que generan menos calor que otras fuentes de luz artificial y son igualmente eficaces para promover tasas de división y crecimiento máximo. Los tipos más comunes son "Daylight", "Cool-White" y "Grolux". En los sistemas de cultivo a gran escala, se debe diseñar para maximizar la eficiencia en el uso de la luz. Debido a lo anterior en muchos casos numerosos sistemas de cultivo a gran escala de microalgas están configurados para aprovechar la luz solar. Aunque esta elección puede disminuir notablemente los costos de producción, su viabilidad puede depender de la ubicación geográfica y puede presentar riesgos, además de que las tasas de producción pueden fluctuar considerablemente durante diferentes épocas del año [14].

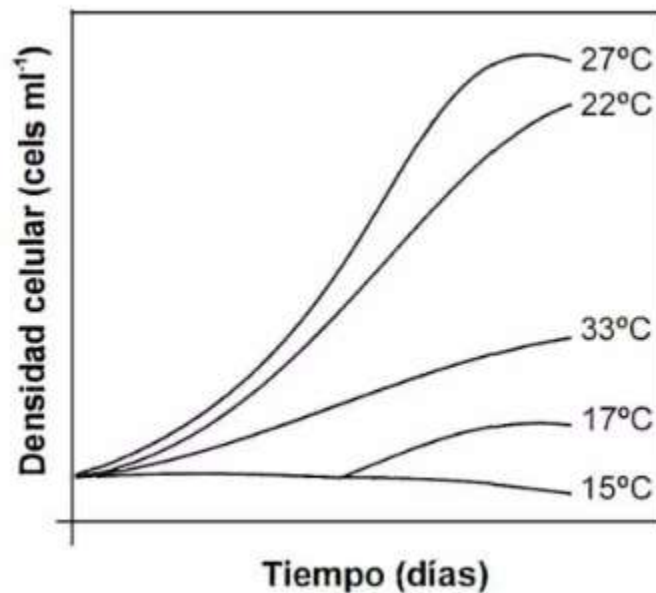
TEMPERATURA

La temperatura desempeña un papel crucial en el desarrollo de las microalgas, siendo otro factor fundamental para su crecimiento. La biomasa de las microalgas responde de manera continua a las variaciones de temperatura en su entorno. A diferencia de otros factores del medio, como el pH, la temperatura celular se equipará a la temperatura del medio de cultivo. Además de influir en las reacciones celulares, la temperatura afecta al metabolismo, los requisitos nutricionales y la composición de la biomasa. Sin embargo, dentro de los rangos óptimos, su efecto sobre la concentración final de biomasa y la producción, así como la composición bioquímica, es mínimo.

En las microalgas, existe una correlación entre la temperatura y la actividad biológica, con un aumento en la tasa de crecimiento a medida que la temperatura aumenta dentro de un rango óptimo. Sin embargo, más allá de este rango, el crecimiento disminuye, a veces de manera abrupta, e incluso puede detenerse por completo si la temperatura sigue aumentando. La mayoría de las algas exhiben una curva de respuesta al crecimiento en función de la temperatura con una meseta amplia, seguida de un declive rápido después del punto óptimo. Este declive se acentúa cuando la intensidad de la luz es alta. La disminución del crecimiento a

temperaturas elevadas puede deberse a la interrupción de la regulación metabólica o incluso a la muerte celular, en la Figura 14 se puede apreciar según lo dicho anteriormente que ese límite de temperatura es 25°C.

Figura 14. Afectación del crecimiento de microalgas respecto a la temperatura



Researchgate. Cultivo de microalgas consultado el 6 de marzo 2024 en https://www.researchgate.net/figure/Figura-9-Interaccion-entre-la-temperatura-intensidad-luminosa-y-tasa-de-crecimiento-en_fig2_340622586

SALINIDAD

La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en aguas dulces como marinas, suele influir en el crecimiento de las microalgas debido a su actividad osmótica, esto quiere decir que estas suelen tener barreras naturales semipermeables que evitan la acción de las sales a nivel celular. La tolerancia a la sal varía según las especies; algunas solo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal, mientras que otras pueden sobrevivir en soluciones saturadas. Lo que resulta en un estrés salino letal para un grupo de especies puede ser fácilmente tolerado por otro grupo. En términos de adaptación a la salinidad, las algas se pueden clasificar en halotolerantes y halofílicas.

La salinidad no solo desencadena la osmorregulación, sino que también provoca otros cambios fisiológicos en las células microalgales, como la pérdida de la actividad fotosintética. Además, la respuesta adaptativa al estrés salino puede conferir resistencia a otras condiciones de estrés, como el calor, la baja temperatura o la baja actividad del agua.

Es muy común que las microalgas, especialmente las marinas, pueden tolerar un amplio rango de salinidades. Sin embargo, la salinidad puede ser un factor condicionante significativo cuando se combina con otros factores. A pesar de esto, se ha prestado poca atención al efecto de las variaciones de la salinidad en el crecimiento de los cultivos de microalgas marinas en comparación con otros factores que afectan a la productividad.

Los estudios sobre el efecto de la salinidad en diferentes especies de microalgas marinas han demostrado que el rango óptimo de salinidad varía entre las especies. Algunas solo crecen en un rango estrecho de salinidad, mientras que otras pueden crecer en un rango más amplio. La salinidad es un factor importante a considerar, especialmente en entornos cerrados como bahías, estuarios y rías, donde puede fluctuar debido a la evaporación y la dilución durante la época de lluvias. A pesar de estas variaciones, las microalgas marinas suelen ser tolerantes a cambios de salinidad y pueden crecer en un rango considerable de concentraciones salinas [15].

AGITACION

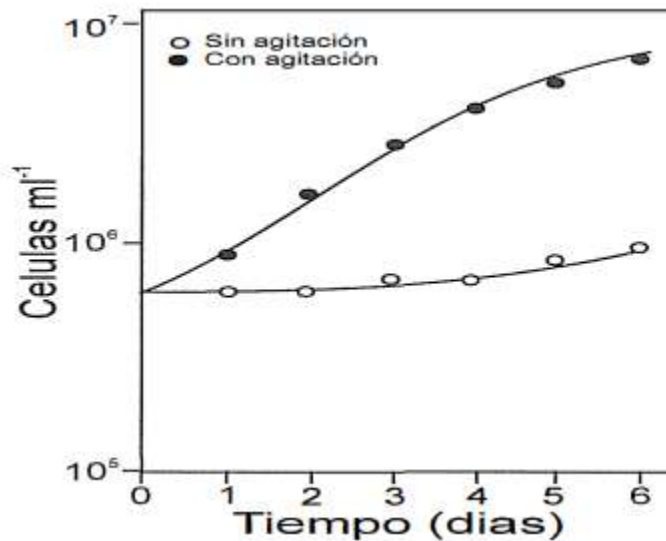
Una correcta agitación del medio de cultivo es esencial y tiene un impacto directo en el cultivo de microalgas. Cuando se satisfacen los requisitos y las condiciones ambientales son favorables, la agitación se convierte en el factor más importante para obtener altos rendimientos de biomasa microalgal.

La agitación provoca el movimiento del agua, lo que conlleva una serie de efectos positivos como:

- Garantiza una distribución uniforme de las células y los nutrientes en todo el cultivo, lo que permite que los nutrientes estén disponibles rápidamente para las células. Esto impide la formación de gradientes nutricionales alrededor de las células microalgales durante los períodos de metabolismo activo. Dichos gradientes pueden restringir el crecimiento y se evitan con una agitación adecuada. Una célula que permanece estática en el agua agota rápidamente los nutrientes presentes en la microcapa que la rodea, lo que disminuye las tasas de absorción de nutrientes a medida que la microcapa se reabastece lentamente por difusión desde el agua circundante. La agitación interrumpe estos microgradientes, aumentando la exposición de las células a nutrientes y mejorando las tasas de absorción.
- Mejora la distribución de la luz a las células para garantizar su actividad fotosintética. La agitación evita el sombreado causado por un cambio continuo en la posición relativa de las células con respecto a la zona iluminada. En un cultivo bien agitado, las células individuales están expuestas a la misma intensidad de radiación incidente, aunque experimenten grandes variaciones temporales en dicha intensidad. El movimiento rápido de las células desde la zona iluminada a la zona profunda del tanque y su regreso a la zona iluminada generan un patrón dinámico de luz-oscuridad para las células individuales.
- Evitar la sedimentación de las células en el fondo del recipiente de cultivo estimula el metabolismo celular en general.
- Otra razón para mantener la agitación está relacionada con los gradientes gaseosos que se forman alrededor de las células microalgales durante su actividad metabólica. Estos gradientes pueden restringir la tasa de crecimiento de un cultivo. Una alta densidad de células fotosintéticamente activas puede provocar concentraciones extremadamente altas de oxígeno disuelto, lo que resulta en una supersaturación de oxígeno por encima del

400% durante las horas de máxima fotosíntesis y en condiciones de estancamiento. Muchas microalgas son sensibles a concentraciones elevadas de oxígeno, lo que puede inhibir la fotosíntesis, especialmente cuando la concentración de dióxido de carbono es baja. La agitación disminuye la tensión de oxígeno en el cultivo.

Figura 15. Gráfico de crecimiento de microalgas con y sin agitación



Researchgate.net. Cultivo de microalgas consultado el 6 de marzo 2024 en https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRIFeicitqiBLEM_xO-OwBVp_6uxzvKyhmyZKRoUzBifoE5rU0

Además, la agitación ayuda a prevenir la estratificación térmica. En los tanques de cultivo sin agitación, puede haber diferencias significativas de temperatura entre la superficie y el fondo, lo que puede provocar la formación de zonas anóxicas y con mal olor. La agitación adecuada evita que las algas muertas y otros desechos orgánicos se depositen en el fondo, lo que podría conducir a condiciones anaeróbicas y a la pérdida del cultivo. La agitación se puede lograr mediante diversos métodos, como la agitación mecánica, bombas de aire o aireación [16].

NUTRIENTES

Para tener un óptimo cultivo se debe agregar de manera adecuada la cantidad de nutrientes que estas requieran, variando así de las diferentes cepas de microalgas que hay, algunos de ellos son [17]:

- **Fuentes de Carbono:** Es el macronutriente con mayor importancia, llegando a ser el 50% de la constitución de biomasa microalgal. Siendo un limitante al momento de cultivar distintas especies de zooplancton, ya que muchas de ellas solo pueden utilizar este compuesto para su crecimiento.
- **El CO_2 :** es suministrado de forma general con una mezcla de aire, esto produce un leve burbujeo el cual facilita la agitación del cultivo dando como resultado un medio más homogenizado.
- **Nitrógeno:** Seguido del carbono, el nitrógeno es el elemento de mayor importancia en contribución a la composición bioquímica de la materia seca de las células microalgales, sin embargo, este aditamento debe hacerse una vez este oxidado el compuesto, siendo anexada en sus formas de nitrato, nitrito y amonio. De una manera más general, las amidas, urea, glutamina y asparagina, resultan buenas fuentes de nitrógeno, también distintos aminoácidos, como la glicina, serina, ácido glutámico o ácido aspártico, también pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno. La urea es una buena fuente de nitrógeno para casi todas las especies de microalgas. En las microalgas se conocen 2 enzimas que metabolizan la urea: la ureasa y la urea amidoliasa. Estas pueden llegar a tener una de estas, pero no ambas.
- **Fosforo:** Es un nutriente el cual interviene en su mayoría en los procesos celulares para la transferencia energética y la sinterización de ácidos nucleicos. Como fuente de fósforo se utiliza fundamentalmente fosfato inorgánico.

Otros Nutrientes

- El azufre se toma como sulfato inorgánico y es fundamental para la división celular.
- El calcio varía mucho entre las especies y está relacionada con el tipo de pared celular.
- El sodio, potasio y cloro son universalmente requeridos por las microalgas, actuando el sodio y el potasio como activadores de enzimas, mientras que el cloro es fundamental para la fotosíntesis.
- El magnesio forma parte de la molécula de clorofila y determina la agregación de ribosomas.

6.4.2. Biorreactores

Los fotobiorreactores (FBRs) son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas. Para ello, tienen que mantener un medio estable (temperatura, pH, baja concentración de O_2) y proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento incluyendo la luz. Existen dos filosofías de diseño opuestas. Los reactores abiertos aceptan un control pobre del entorno mientras que los FBR cerrados consiguen unas condiciones estrechamente controladas que permiten a las microalgas crecer a una velocidad óptima a cambio de un mayor costo [18].

Fotobiorreactores abiertos

En los fotobiorreactores abiertos el cultivo está en contacto con la atmósfera. Los fotobiorreactores son instalaciones que intentan compensar con un bajo costo una baja productividad debida a un control poco estricto o inexistente de condiciones como el pH o la temperatura. Al estar abiertos son susceptibles a la invasión de otros microorganismos incluyendo microalgas, por lo que son especialmente adecuados para especies robustas y de rápido crecimiento [19].

Sin embargo, pese a estos inconvenientes, la mayoría de las microalgas producidas en el mundo provienen de este tipo de sistemas. Su gran ventaja es que es fácil y económico construirlos en grandes volúmenes incluso de cientos de metros cúbicos.

Existen dos tipos básicos de fotobiorreactores abiertos: "open ponds" que, como su nombre indican son simples receptáculos del tamaño y forma adecuado. En términos simples estos son jagüeyes o balsas de gran tamaño que cuentan con poca profundidad y no presentan sistema de agitación, los cuales se llenan de nutrientes y se deja crecer la microalga de forma natural o artificial sin que se altere el medio, disponen de una manutención reducida, al carecer de movimiento productividad de unidad por volumen es muy baja, siendo esto compensado con sus grandes extensiones. Dicho esto, el tipo de microorganismo debe ser robusto; por ejemplo, la *Dunaliella Salina*, capaz de sobrevivir en concentraciones Salinas.

Figura 16. Ejemplo de Reactor Abierto



Openponds, La laguna Hutt en Australia es un lago salado natural consultado el 7 de 03 de 2024 en <https://acortar.link/JCfl70>

Los "raceways" que, además son capaces de suministrar agitación y mezcla, facilitar el intercambio de gases e incluso controlar el pH en cierta medida.

Figura 17. Sistema de cultivo raceway



Seambiotic, sistemas de estanques abiertos Consultado el 8 de marzo de 2024 en <https://acortar.link/YIH8tE>

Microalgas de acuario

Dentro de un ecosistema como el representado por un acuario, existen diferentes microorganismos que pueden ser utilizados como materia prima, entre ellos diferentes especies de microalgas. Por lo general, su presencia es indicativa de problemas ya que modifica los parámetros nutricionales y la estética del acuario. Sin embargo, existen microalgas benéficas para el entorno, ya que están presentes en pequeñas cantidades y son indicativos de una buena calidad de agua, además de eliminar los fosfatos y liberar oxígeno [20].

Existen un sinnúmero de microalgas que crecen en un acuario que van desde marrones, azules, hasta rojas, sin embargo, las más importantes son las microalgas verdes. Dentro de este grupo se pueden citar a las responsables de la denominada agua verdosa que son las unicelulares y a las filamentosas. Las unicelulares se presentan libremente en el agua o fijas sobre objetos decorativos y hojas de las plantas en forma de puntos. Su invasión se debe principalmente a un exceso de nutrientes no aprovechados por las plantas y a un fotoperiodo excesivamente largo o como resultado directo de la luz solar. Pueden presentar una gran variedad de formas y tamaños, su reproducción es asexual. Algunas de estas microalgas son muy

parecidas a pequeñas plantas, donde se distinguen tallos, hojas y raíces. Otras viven asociadas a hongos formando líquenes [21].

6.4.3. Casos de estudio

Después de analizar los factores ambientales que influyen en el desarrollo de los cultivos de microalgas *Chlorella*, se procede a buscar información académica pertinente para investigar estas condiciones con mayor profundidad.

El estudio titulado "Cuantificación de biomasa de microalgas mediante procesamiento de imagen digital y análisis de color RGB" emplea el procesamiento de imágenes digitales basado en el modelo de color rojo-verde-azul (RGB) para evaluar la biomasa celular de tres microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* y *Ettlia sp.* Los experimentos incluyeron cultivos tanto diluidos como concentrados de estas microalgas para generar diferentes concentraciones de peso seco de células (DCW). Se utilizó una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) para capturar imágenes de las muestras de microalgas en una cámara oscura iluminada uniformemente desde abajo.

Este método se demostró ser eficaz y sencillo para estimar la biomasa de microalgas, con un rango de medición efectivo de hasta 3g DCW L⁻¹. Específicamente, se observó que el valor del color azul disminuía de manera lineal con el peso seco de las células en este rango dinámico de medición en todas las microalgas analizadas. Además, la correlación general entre los valores RGB y los tonos grises, mediante la aplicación de un algoritmo de luminiscencia, mostró patrones similares.

Notablemente, el valor del color azul permitió predecir las concentraciones de biomasa de *C. Vulgaris*, *B. Braunii* y *Ettlia Sp.* con errores promedio de 13%, 16% y 8%, respectivamente, lo cual fue significativamente más preciso que la conversión a tonos grises. Por lo tanto, este método podría sentar las bases para el desarrollo de una técnica más amplia y precisa para la medición de la biomasa de microalgas.

El análisis RGB emerge como una herramienta sencilla y económica para evaluar la biomasa de microalgas, con una operación fácil y a bajo costo. Además, al considerar que las variaciones de color en las microalgas reflejan cambios fisiológicos, el procesamiento de la intensidad del color de las imágenes digitales según un análisis de modelo RGB puede resultar útil para detectar dichos cambios. Se proyecta que esta técnica sea aplicada en la evaluación de la calidad celular en fotobiorreactores y estanques de cultivo, siendo tema de futuras investigaciones.

En última instancia, el procesamiento de imágenes digitales exhibe un potencial considerable como una técnica rentable para medir la biomasa en diversos campos de investigación [22].

Tanto las imágenes macroscópicas de las muestras como los resultados obtenidos del análisis RGB para todas las microalgas revelaron una variación de color significativa con la concentración celular. Las tres microalgas estudiadas exhibieron un patrón similar en la relación entre los valores de peso seco de células (DCW) y RGB, lo que subraya el potencial de esta técnica para la cuantificación de biomasa de microalgas. En general, el software de análisis de imágenes demostró ser adaptable a varios tipos de microalgas. Se profundizó en la validez y la simplicidad del análisis RGB, especialmente en el color azul, al compararlo con otros métodos de procesamiento de imágenes macroscópicas. Otros investigadores han propuesto diversos enfoques para mejorar los modelos de color y escala de grises, así como su aplicación para la estimación de biomasa basada en imágenes macroscópicas de cultivos celulares. Por ejemplo, emplearon un nuevo método para convertir imágenes en color a escala de grises, lo que resultó en un rango dinámico de medición mejorado.

Para evaluar la precisión de esta correlación en escala de grises en la cuantificación de biomasa y compararla con la del color azul, se tomaron imágenes de varias muestras de tres microalgas con concentraciones de biomasa conocidas. El error

medio entre las concentraciones de biomasa reales y las previstas para *C. Vulgaris*, *B. Braunii* y *Ettlia Sp.* fue de 31%, 19% y 11%, respectivamente, en la correlación de escala de grises. En contraste, utilizando el perfil de color azul individual para cada especie, estos errores fueron de 13%, 16% y 8%, respectivamente. Estos resultados sugieren que el análisis RGB basado únicamente en el color azul fue más preciso que el método de conversión a tonos grises en el caso de las microalgas [23].

Es recomendable para la toma de muestras fotográficas un escenario idóneo, ver Figura 19 y Figura 20, con un espacio donde se pueda controlar la iluminación, para que de esta manera se eviten sombras, y al momento de tomar una fotografía, esta proporcione con mayor precisión los datos que posteriormente serán evaluados a través del software matemático. A continuación, modelo de caja diseñada para tener una idoneidad en las fotografías, donde se aprecia el circuito diseñado para controlar la iluminación, una caja interna en acrílico con pantallas difuminadoras para tener de manera uniforme la radiación lumínica y una caja externa la cual hace cofre para tener para mantener la luz externa alejada y no interfiera en las fotografías y los atributos microlagales.

En el laboratorio del grupo de investigación MAGYA de la Universidad Popular del Cesar, se llevó a cabo un cultivo de microalgas *Chlorella*, el cual se diseñó para verificar como el uso de análisis de imágenes de manera digital serviría para verificar el correcto crecimiento de las muestras en el experimento. El cual se basaba en el principio visto en la Figura 18, el cual por efecto de la pandemia y cierre de los laboratorios no pudo prosperar y las microalgas al perder condiciones de desarrollo aptas para lo mismo perecieron.

Figura 18. Metodología de trabajo en laboratorio (MAGYA)



Fuente: los autores

De lo anterior se pudo obtener resultados parciales, los cuales demostraron que las condiciones como la temperatura, PH y luminosidad influyen de manera directa en el desarrollo de este tipo de cultivos, brindando resultados no satisfactorios en la consecución de un cultivo sostenible para dichas instalaciones.

Aun así, se diseñó un hardware para la obtención de fotografías, el cual consiste en una estructura en madera con paredes internas de color blanco para maximizar la luz entregada por un sistema led de color blanco de luz artificial, dentro de la cual se ubicaría una placa de peltre con las microalgas para la captura de la imagen, ver Figura 19.

Figura 19. Estructura de contención de madera con iluminación artificial



Fuente: los autores

Además, dicha estructura sería contenida en otra estructura más grande sobre la cual se tendría un control de la iluminación y de la temperatura, el cual impide el acceso de otro tipo de luz, que afecte las tomas de fotografías, ver Figura 20.

Figura 20. Estructura de contención mayor

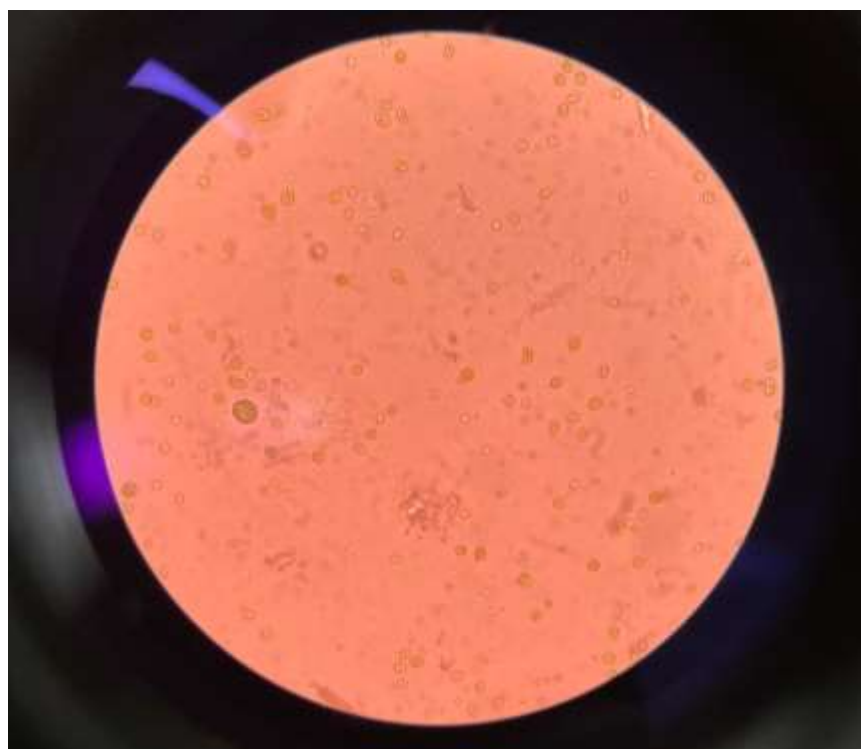


Fuente: los autores

Los resultados obtenidos fueron muy pobres y no permitieron la proliferación del alga como fue esperado en su momento, ver Figura 21, Las condiciones

ambientales desfavorables, tales como cambios abruptos de temperatura, niveles inadecuados de nutrientes o iluminación insuficiente, crearon un entorno poco propicio que impidió el crecimiento y desarrollo óptimo de las microalgas. Estas condiciones adversas dificultaron la capacidad de las microalgas para llevar a cabo procesos metabólicos esenciales, como la fotosíntesis y la reproducción celular, lo que a su vez afectó negativamente su capacidad de acumular biomasa. En consecuencia, el ambiente no permitió el desarrollo deseado de las microalgas, limitando su potencial productivo y comprometiendo los objetivos del cultivo.

Figura 21. Resultados obtenidos al inicio de la implementación



Fuente: Fotografía tomada desde un microscopio a uno de los cultivos realizados en el laboratorio MAGYA de la Universidad Popular del Cesar.

En el estudio de *evaluación del ph y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel* en el cual todos los ensayos llevados a cabo durante el tiempo de experimentación se trabajaron en un cuarto acondicionado el cual

permitió mantener la temperatura oscilando entre 26°C ±2, con una intensidad lumínica de 3000 lux, generada por lámparas de luz día y un fotoperiodo de mantenimiento de las cepas de 24 horas luz. Como variables de experimentación se evaluaron dos concentraciones de nitrógeno y dos pH iniciales para cada microalga. Las dos cepas fueron cultivadas en medio enriquecido de Walne (Conwy), variando el pH con la adición de NaOH (0,1 N) para los cultivos con *Chlorella* [24].

Ensayos de Nitrógeno y PH

Se realizaron ocho experimentos duplicados con variaciones en la concentración de nitrógeno y pH. Los valores iniciales de pH del medio de crecimiento evaluados en cada ensayo (7,5 y 8,5) se seleccionaron considerando el crecimiento óptimo que presentan las microalgas *Chlorella* nativas en ambientes con pH neutro a básico. Por otro lado, los valores iniciales de concentración de nitrógeno (0,025 y mg/l) se escogieron tomando como referencia valores cercanos a los propuestos por el medio de cultivo estándar Conwy, que es de 0,016 mg/L.

Tabla 2. Valores de prueba para PH y Nitrógeno

Bloque	Microalga	[N]	pH	Nomenclatura
1	<i>Chlorella nativa</i>	0,025	7,5	CN1.1
1	<i>Chlorella nativa</i>	0,1	8,5	CN2.1
1	<i>Chlorella nativa</i>	0,025	8,5	CN3.1
1	<i>Chlorella nativa</i>	0,1	7,5	CN4.1
2	<i>Chlorella nativa</i>	0,025	7,5	CN1.2
2	<i>Chlorella nativa</i>	0,1	8,5	CN2.2
2	<i>Chlorella nativa</i>	0,025	8,5	CN3.2
2	<i>Chlorella nativa</i>	0,1	7,5	CN4.2

evaluación del ph y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel pagina 38.

Para comparar los promedios del número de células de las microalgas *Chlorella* nativa y *Dunaliella* salina en relación con las variables de estudio, concentración de

nitrógeno y pH, se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el software Statgraphics Centurion. Se empleó la herramienta de ANOVA multifactorial y se aplicó el test de Tukey's HSD (Honestly Significantly Different), el cual consiste en una técnica estadística utilizada para comparar todas las posibles combinaciones de medias de varios grupos. Este test determina si existe una diferencia significativa entre las medias de dos grupos y ayuda a identificar cuáles grupos difieren entre sí. Es especialmente útil después de realizar un análisis de varianza (ANOVA) para determinar qué tratamientos o condiciones específicas están contribuyendo a las diferencias observadas en los datos. El ANOVA multifactorial, es una técnica estadística utilizada para analizar la variación en los datos que resulta de la interacción entre dos o más factores. Este permite evaluar cómo múltiples factores influyen simultáneamente en una variable de interés, fue determinar si existían diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los factores de estudio (concentración de nitrógeno y pH). Dado que se encontraron tales diferencias, se procedió a realizar el test de Tukey's HSD para identificar cuál factor era el más determinante.

La concentración celular se evaluó utilizando una cámara de Neubauer, la cual es un dispositivo utilizado para contar células o partículas en una muestra líquida bajo un microscopio. Consiste en una cuadrícula marcada con líneas finas y espaciadas de manera precisa que subdividen el área en pequeños cuadrados conocidos como cuadrantes. Estos cuadrantes tienen dimensiones específicas y permiten calcular la concentración celular o de partículas en la muestra mediante el recuento de las células o partículas presentes en un número determinado de cuadrantes y utilizando una fórmula específica. Para la *Chlorella*, se tomó un volumen de 20 ml de solución utilizando una pipeta Pasteur, y se llevó a cabo el conteo.

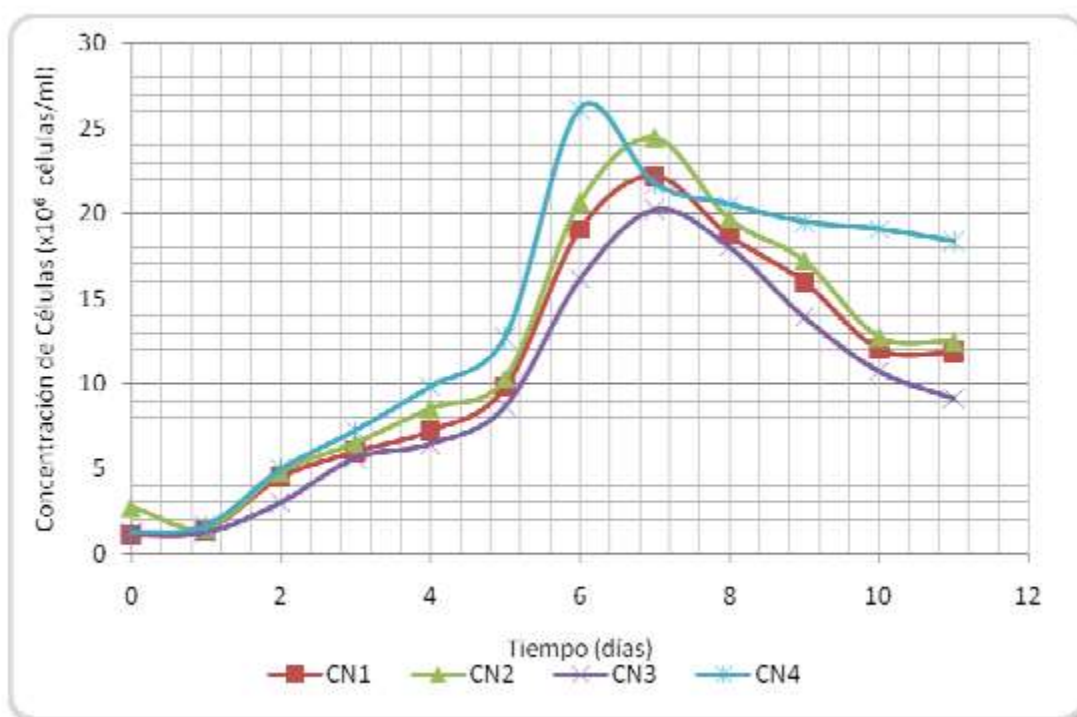
Se pudo determinar los valores iniciales de pH y concentración de nitrógeno en el medio de cultivo líquido que permitieran alcanzar una alta densidad celular para la microalga *Chlorella* nativa. Se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos en las pruebas, seguido de un análisis cinético que proporcionó una

evaluación exhaustiva de la influencia de estos factores en los cultivos de *Chlorella* nativa.

En los bioensayos realizados, se calculó un promedio de las densidades celulares alcanzadas durante 11 días de monitoreo. Estos valores se analizaron utilizando el software Statgraphics, donde se aplicó la herramienta ANOVA y el test de Tukey con un nivel de confianza del 95% para cada factor de crecimiento.

El análisis del crecimiento de la microalga *Chlorella* nativa a lo largo de sus distintas etapas, Figura 22, facilita la determinación de sus constantes cinéticas, intervalos de tiempo de reacción y factores relevantes que deben considerarse al momento de la cosecha, con el fin de aprovechar los períodos en los que la biomasa microalgal esté más presente.

Figura 22. Curva de crecimiento de distintas condiciones de PH y Nitrógeno



evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel pagina 45.

La primera fase, conocida como fase de latencia o de adaptación, abarcó desde el día 0 (cuando se trasladó una porción del cultivo inóculo a un volumen de 4 L) hasta el día siguiente (día 1), cuando la microalga se adaptó a las condiciones del medio establecido. Los resultados mostraron un comportamiento similar en los bioensayos CN1, CN3 y CN4, ya que no experimentaron variaciones en su concentración celular. Por otro lado, el ensayo CN2 mostró un ligero descenso en el crecimiento durante el período de adaptación, pero logró recuperarse al día siguiente para iniciar su fase exponencial.

La segunda fase, denominada fase exponencial, comenzó entre los días 2 y 5 en todos los bioensayos (CN1, CN2, CN3 y CN4), como se observa en la Figura 22. Esta etapa representa el período donde la cinética del proceso es más evidente y se determinan los valores de la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (T_d). Se observó que el bioensayo CN4 alcanzó la máxima velocidad de crecimiento (0.461) y el menor tiempo de duplicación (1.504 días). Todos los bioensayos se ajustaron a una tendencia exponencial, lo que indica que respondieron de manera óptima a los medios de cultivo propuestos.

El cultivo de *Chlorella* nativa que exhibió la mayor densidad celular fue aquel que fue evaluado bajo un pH bajo y con la concentración más alta de nitrógeno dentro de las condiciones experimentales. En el sexto día de cultivo, se recolectaron 11.83g de biomasa con un contenido de aceite del 40.23%, lo que resultó en productividades de biomasa y lípidos competitivas en comparación con otras especies de *Chlorella* más especializadas [24].

El caso de estudio de R. Moronta, R. Mora y E. Morales llamado *Respuesta de la microalga Chlorella Sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas, es un poco más extensivo en cuanto a cantidad de pruebas*

y variaciones realizadas sobre los cultivos de las microalgas Chlorella. En este el cultivo de microalgas de interés económico en condiciones no axénicas puede ser utilizado para acuicultura y tratamiento de aguas residuales; mientras que el cultivo axénico es utilizado para la extracción de productos comerciales. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas axénicas puede variar con respecto a las cultivadas en condiciones no axénicas. El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta de la microalga *Chlorella Sorokiniana* en función del pH (5, 6, 7, 8 y 9), temperatura (25, 30, 37, 40 y 42°C) y salinidad (15, 25 y 35 ppm) en cultivos no axénicos y axénicos. Todos los bioensayos se realizaron con fotoperíodo 12:12h, 98µmol.quanta.m-2.s-1, 28°C. Los cultivos no axénicos con medio ALGAL por triplicado se mantuvieron en volumen de 250ml, en matraces de 500ml de capacidad. Mientras que, los cultivos axénicos por cinco réplicas se realizaron en tubos de ensayo con volumen de 15ml, en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas con medio organotrófico. En cultivos no axénicos, la microalga fue más sensible a la salinidad, temperatura y pH <5, con un crecimiento óptimo a 30°C y pH 7-8 en medio no salino. En cambio, en condiciones axénicas, la microalga fue capaz de crecer hasta 42°C, 35 ppm de salinidad, a partir de pH 3 alcanzando mayor crecimiento a pH 7-8, entre 0 y 25 ppm y a 37°C en mixotrofia. La síntesis de clorofila fue mayor en cultivos no axénicos. Estos resultados sugieren que la respuesta de *C. sorokiniana*, al pH, temperatura y salinidad puede ser modulada por la flora bacteriana asociada.

Como resultados de este estudio se pudo demostrar que la respuesta de la microalga *Chlorella Sorokiniana* a variaciones en el pH, salinidad y temperatura mostró diferencias dependiendo de si estaba presente o no su flora bacteriana asociada. En condiciones no estériles, solo pudo prosperar dentro de un rango de pH entre 6 y 9, alcanzando su máxima densidad celular a 30°C y creciendo mejor en ausencia de salinidad.

Sin embargo, en condiciones estériles, cambió su tolerancia hacia pH ácidos y demostró capacidad para crecer a temperaturas de hasta 42°C y salinidades de 25 ppm. Este cambio de comportamiento sugiere que la respuesta fisiológica de la

microalga ante su entorno natural se vio alterada cuando se eliminó la interacción con sus bacterias asociadas. Además, se observó que la mixotrofia fue la condición más favorable para el crecimiento de la microalga frente a cambios ambientales.

Por tanto, esta microalga autóctona muestra un gran potencial biotecnológico en condiciones estériles debido a su capacidad para crecer en cultivos mixotróficos y heterotróficos en presencia de nutrientes orgánicos y en un amplio rango de pH. Esto podría ser una alternativa interesante a las condiciones autotróficas de cultivo, especialmente para la producción de biomasa a altas temperaturas, lo que podría inducir la producción de enzimas, proteínas o compuestos con actividad biológica para aplicaciones farmacológicas [25].

Los datos recopilados y analizados en los estudios sobre el cultivo de microalgas revelan la importancia de diversos factores ambientales en su crecimiento y productividad. Demostrando que las condiciones de pH, concentración de nitrógeno, salinidad y temperatura tienen un impacto significativo en el desarrollo de las microalgas, especialmente en su densidad celular y en la síntesis de compuestos de interés comercial. En condiciones no axénicas, se ha encontrado que las microalgas tienden a prosperar mejor en rangos de pH neutros a básicos, con concentraciones adecuadas de nitrógeno en el medio de cultivo. Esto sugiere que mantener un pH óptimo y niveles adecuados de nutrientes puede favorecer un mayor crecimiento y productividad en el cultivo de microalgas.

Por otro lado, se ha observado que la presencia de flora bacteriana asociada puede influir en la respuesta de las microalgas a condiciones ambientales extremas. En cultivos estériles, las microalgas pueden mostrar una mayor tolerancia a pH ácidos, altas temperaturas y salinidades elevadas, lo que sugiere una adaptación a condiciones más adversas cuando se elimina la interacción con bacterias asociadas.

6.4.4. Algoritmos de procesamiento digital de imágenes en la determinación de concentración de biomasa en microalgas

Los algoritmos de procesamiento digital de imágenes han experimentado una notable evolución y desarrollo en su aplicación para la determinación de la concentración de biomasa en las microalgas *Chlorella*. Estos avances han sido impulsados por la creciente importancia de las microalgas en diversos campos, como la producción de biocombustibles, alimentos y productos farmacéuticos. Inicialmente, los métodos tradicionales de medición de biomasa en microalgas se basaban en técnicas manuales y tediosas que implicaban el recuento visual de las células al microscopio. Sin embargo, con el advenimiento de la tecnología digital, se introdujeron nuevos enfoques basados en el procesamiento de imágenes.

Los primeros algoritmos de procesamiento de imágenes se centraron en la segmentación de las células de microalgas a partir de imágenes capturadas por microscopios ópticos. Estos algoritmos utilizaban técnicas de Umbralización y segmentaciones basadas en la intensidad de píxeles para identificar y contar las células en las imágenes.

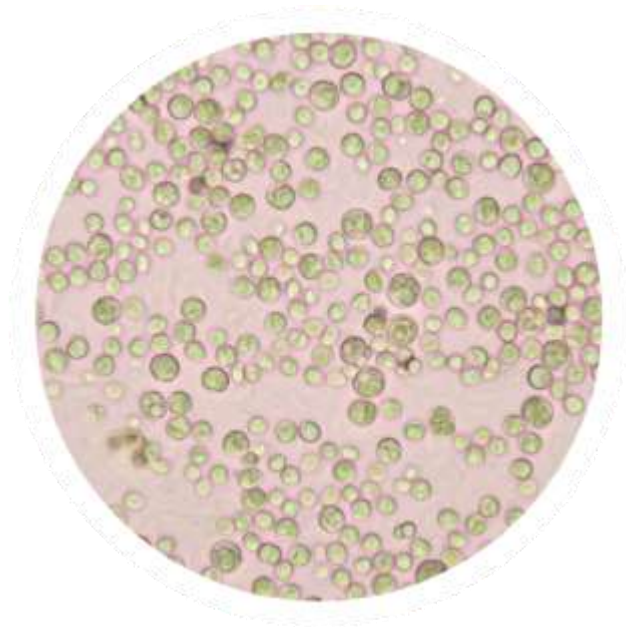
Con el tiempo, se han desarrollado algoritmos más sofisticados que incorporan técnicas de aprendizaje automático y visión por computadora. Estos algoritmos pueden analizar imágenes de microalgas con mayor precisión y rapidez, extrayendo características morfológicas y texturales de las células para estimar la concentración de biomasa con mayor precisión.

Además, se han desarrollado técnicas de procesamiento de imágenes en tiempo real que permiten monitorear el crecimiento de las microalgas de manera continua y automatizada. Estos sistemas pueden integrarse con sistemas de cultivo de microalgas para controlar y optimizar las condiciones de cultivo en tiempo real.

Algoritmo de Umbralización global

El algoritmo de Umbralización global es una técnica de procesamiento de imágenes que se utiliza para segmentar una imagen en regiones binarias (blanco y negro) basadas en un valor umbral. En el contexto de las microalgas, este algoritmo puede ser utilizado para separar las células de microalgas del fondo de la imagen, lo que facilita su análisis y cuantificación sobre la Figura 23, será usada para presentar los distintos algoritmos

Figura 23. Muestra de ensayo de microalgas *Chlorella*



Allmicroalgae, muestra de microalgas Chlorella consultado el 10 de marzo de 2024 en <https://www.allmicroalgae.com/wp-content/uploads/2020/08/chlorella2-min.png>

Para ilustrar cada uno de estos algoritmos, se empleó Google Colab, una plataforma en línea que posibilita la programación en Python y otros lenguajes de manera remota. Una de las ventajas destacadas de Colab es su capacidad para proporcionar acceso a una GPU en la nube de forma gratuita, lo que agiliza significativamente el procesamiento de cálculos intensivos. Esta funcionalidad resulta especialmente beneficiosa para tareas que requieren un gran poder de cómputo, como el procesamiento de imágenes con algoritmos de visión por computadora.

En la Figura 24, se tiene un algoritmo el cual utilizando la función `threshold` de la biblioteca OpenCV (`cv2`) en Python para aplicar un umbral a una imagen. Aquí está la explicación de los parámetros:

El primer parámetro es la imagen la cual se desea Umbralizar, el segundo argumento es el valor de umbral que se desea aplicar, si el valor del pixel es menor será igual a 0 y si es mayor será igual al tercer argumento, que es el valor máximo que tomaran los pixeles, por último, se indica el tipo de Umbralización que será aplicado

Figura 24. Código para la aplicación de Umbralización en una imagen de muestra

```
import cv2
from matplotlib import pyplot as plt

image = cv2.imread('chlorella2-min.png', 0)

_, thresh = cv2.threshold(image, 192, 255, cv2.THRESH_BINARY)

plt.figure(figsize=(10, 5))

plt.subplot(1, 2, 1)
plt.imshow(image, cmap='gray')
plt.title('Imagen Original')
plt.axis('off')

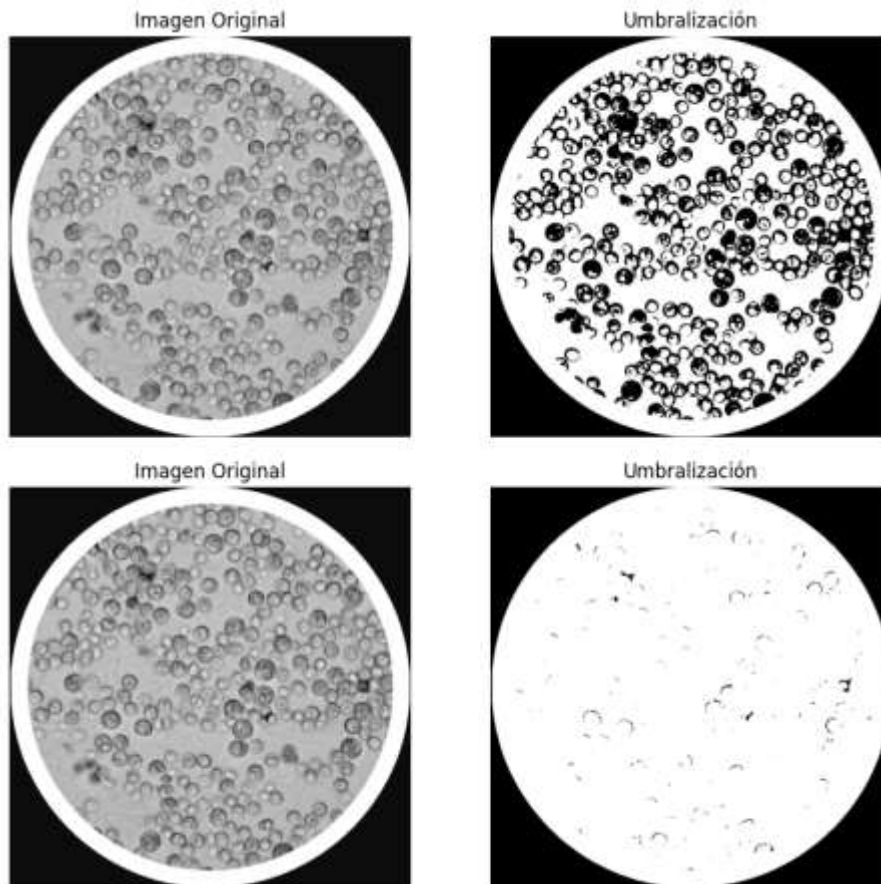
plt.subplot(1, 2, 2)
plt.imshow(thresh, cmap='gray')
plt.title('Umbralización')
plt.axis('off')

plt.show()
```

Fuente: los Autores

El método de Umbralización puede ser fácilmente aplicado a una imagen con muy poca capacidad computacional, además que se puede variar la intensidad para la obtención de mejores resultados, esto se puede verificar observando la Figura 25.

Figura 25. Resultado de Umbralización a distintas intensidades



Fuente: los Autores

Algoritmo de segmentación por crecimiento de regiones

Este algoritmo identifica las células de microalgas mediante la detección de regiones de píxeles similares en la imagen. Comienza con una semilla inicial y crece la región alrededor de la semilla, agregando píxeles vecinos que cumplen ciertos criterios de similitud. Este proceso se repite hasta que se han identificado todas las células en la imagen.

En la Figura 26, El primer paso es cargar una imagen. Esta imagen se convierte a escala de grises utilizando `cv2.cvtColor(image, cv2.COLOR_BGR2GRAY)`, lo que simplifica el procesamiento y reduce la complejidad computacional. Se elige un punto de inicio para la segmentación, que en este caso se toma como el punto central de la imagen (`seed_point = (image.shape[0] // 2, image.shape[1] // 2)`).

A continuación, se define un criterio de crecimiento de regiones, que es el umbral de intensidad (`threshold`). Este umbral se utiliza para determinar si un píxel debe ser considerado como parte de la región segmentada o no. El algoritmo de crecimiento de regiones (`region_growing`) se implementa como una función. Comienza con un píxel semilla y expande iterativamente la región agregando píxeles vecinos que cumplan con cierto criterio (en este caso, la diferencia de intensidad con respecto al píxel semilla).

Figura 26. Código para la segmentación por crecimiento de regiones

```
import cv2
import numpy as np
image = cv2.imread("chlorella2-min.png")
gray_image = cv2.cvtColor(image, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
seed_point = (image.shape[0] // 2, image.shape[1] // 2)
threshold = 30
def region_growing(image, seed_point, threshold):
    segmented_image = np.zeros_like(image)
    segmented_image[seed_point] = 255
    while True:
        prev_segmented_image = np.copy(segmented_image)
        for i in range(image.shape[0]):
            for j in range(image.shape[1]):
                if segmented_image[i, j] == 255:
                    for x in range(-1, 2):
                        for y in range(-1, 2):
                            if i+x >= 0 and i+x < image.shape[0] and j+y >= 0 and j+y < image.shape[1]:
                                if abs(int(image[i, j]) - int(image[i+x, j+y])) < threshold:
                                    segmented_image[i+x, j+y] = 255
        if np.array_equal(segmented_image, prev_segmented_image):
            break
    return segmented_image

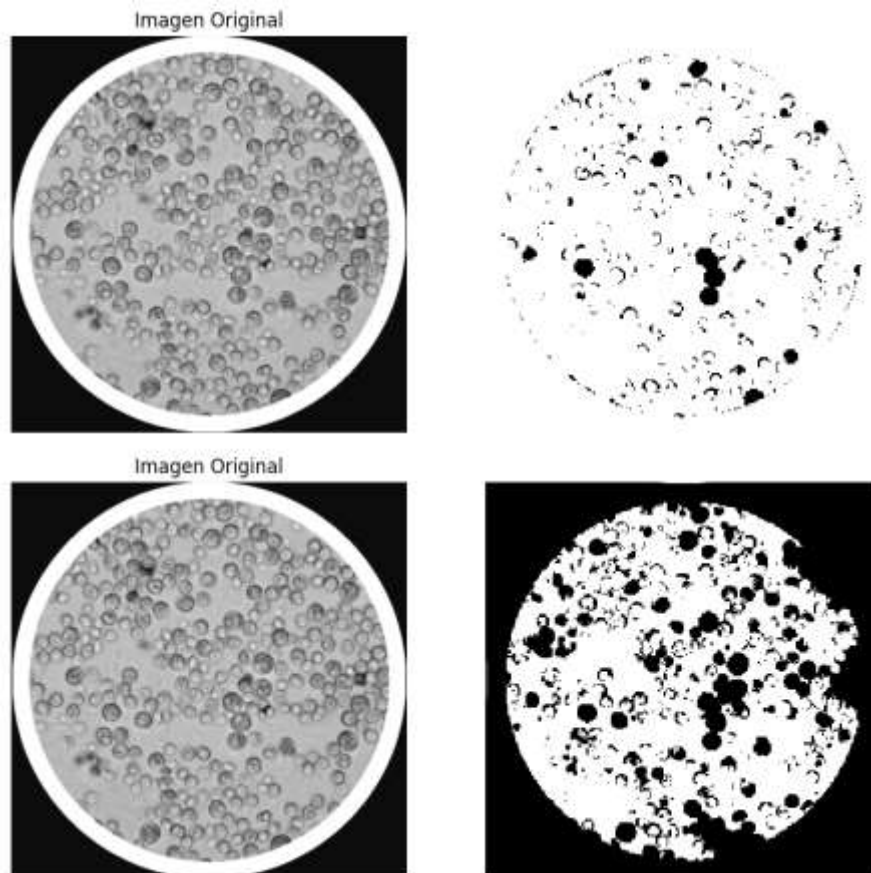
segmented_image = region_growing(gray_image, seed_point, threshold)

cv2.imshow("Segmented Image", segmented_image)
cv2.waitKey(0)
cv2.destroyAllWindows()
```

Fuente: los Autores

Los resultados obtenidos con el uso de dicho algoritmo, permiten contabilizar de manera fácil o aplicando una ecuación de porcentaje, la cantidad de biomasa que existe en la imagen de prueba, dicho resultado se puede verificar en la Figura 27.

Figura 27. Resultado de segmentación por crecimiento de regiones a distintos rangos



Fuente: los Autores

Algoritmo de detección de contornos

Este algoritmo identifica los contornos de las células de microalgas en la imagen utilizando técnicas de detección de bordes, como el operador de Sobel o el detector de bordes de Canny. Una vez identificados los contornos, se realiza un análisis morfológico para segmentar las células y contarlas.

Este código en Python utiliza la biblioteca OpenCV en un entorno de Colab para procesar una imagen de microalga llamada "chlorella.png". Comienza importando las funciones necesarias y luego carga la imagen. Después, convierte la imagen a escala de grises y aplica un umbral para obtener una imagen binaria. Luego, encuentra los contornos en la imagen binaria y los dibuja en la imagen original. Finalmente, muestra la imagen resultante con los contornos detectados. Este flujo de trabajo permite visualizar los contornos de la microalga, lo que puede ser útil para análisis posteriores, ver Figura 28.

Figura 28. Ejemplo de algoritmo de detección de contornos

```
from google.colab.patches import cv2_imshow
import cv2
import numpy as np

# Cargar la imagen en Colab
image = cv2.imread("chlorella.png")

# Convertir la imagen a escala de grises
gray_image = cv2.cvtColor(image, cv2.COLOR_BGR2GRAY)

# Aplicar un umbral para obtener una imagen binaria
_, threshold_image = cv2.threshold(gray_image, 127, 255, cv2.THRESH_BINARY)

# Encontrar contornos en la imagen binaria
contours, _ = cv2.findContours(threshold_image, cv2.RETR_LIST, cv2.CHAIN_APPROX_SIMPLE)

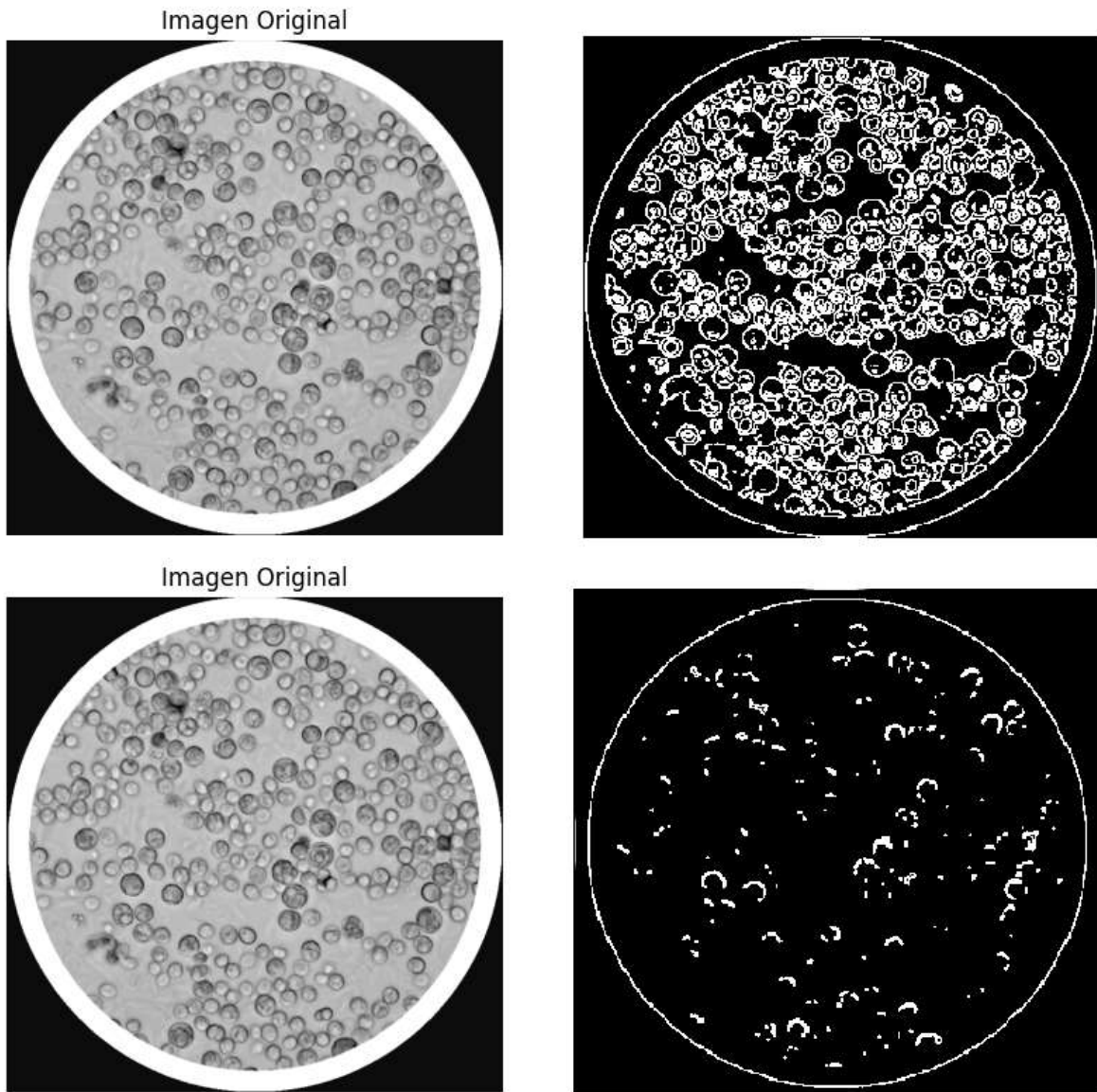
# Dibujar los contornos encontrados en la imagen original
contour_image = np.zeros_like(image)
cv2.drawContours(contour_image, contours, -1, (255, 255, 255), 2)

# Mostrar la imagen con los contornos detectados
cv2_imshow(contour_image)
cv2.waitKey(0)
cv2.destroyAllWindows()
```

Fuente: los Autores

Para la utilización del algoritmo se tiene en cuenta, un factor de umbral que permite modificar el tamaño de los contornos dibujados dentro de las imágenes de muestra esto se puede apreciar en Figura 29.

Figura 29. Ejemplo de Segmentación de contornos



Fuente: los Autores

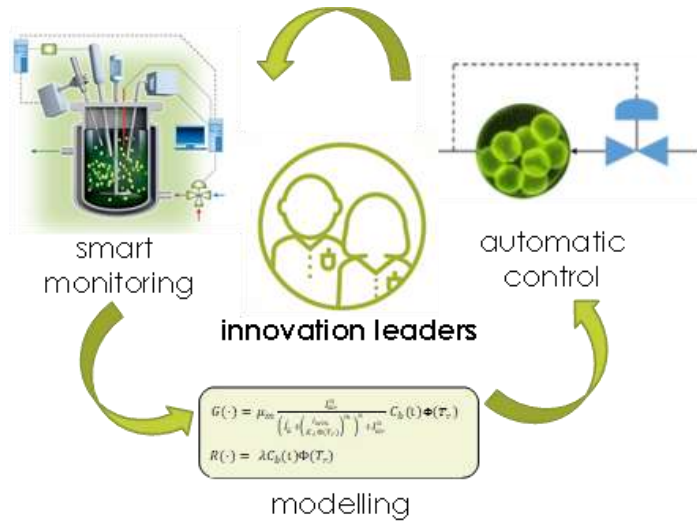
Algoritmo de aprendizaje automático

Este tipo de algoritmo utiliza técnicas de aprendizaje automático, como redes neuronales convolucionales (CNN), para entrenar un modelo que pueda reconocer y contar las células de microalgas en las imágenes. El modelo se entrena con un conjunto de datos de imágenes etiquetadas, las cuales deben ser gran cantidad y especificadas por profesionales competentes para mejorar los resultados obtenidos, además dichos datos se dividen en 2, datos para entrenamiento que suele ser el 90% de los datos, y el restante 10% es para la verificación. Luego se utiliza para analizar nuevas imágenes y estimar la concentración de biomasa.

DIGITALGAE, El propósito de DigitAlgaesation es proponer una estrategia de digitalización destinada a mejorar la gestión y el funcionamiento de los procesos de cultivo de microalgas, con el objetivo de aumentar su eficiencia en la conversión de luz y promover la adopción de procesos sostenibles basados en microalgas en los mercados de productos y energía. La aplicación de inteligencia artificial y métodos de control automático basados en modelos puede resultar fundamental para comprender, optimizar y resolver la discrepancia entre los resultados observados a nivel de laboratorio y las condiciones reales a escala industrial. Esta estrategia aún está en proceso y tuvo como inicio 2021 con financiación hasta el 2024 [26].

Como se puede apreciar en la Figura 30, se tiene un conjunto de sensores de alta precisión sobre biorreactores de microalgas, los cuales según su comportamiento antes distintas entradas permiten su modelado para el estudio por parte de profesionales y la supervisión de la inteligencia artificial bajo entrenamiento.

Figura 30. sistema de funcionamiento de DIGITALGAE



DIGITALGAE, esquema de funcionamiento de DIGITALGAE consultado el 12 marzo 2024 en <https://www2.ual.es/sabana/wp-content/uploads/2024/02/image-8.png>

6.4.5. Inferencia de la eficacia que presenta el uso de los algoritmos de procesamiento digital de imágenes digitales en la determinación de biomasa de las microalgas *Chlorella*.

El uso de algoritmos de procesamiento digital de imágenes en la determinación de biomasa de las microalgas *Chlorella* representa un avance significativo en el campo de la biotecnología y la producción de microalgas. Estos algoritmos, que se han vuelto cada vez más sofisticados con el tiempo, ofrecen una herramienta poderosa para analizar imágenes microscópicas de microalgas con una precisión y rapidez sin precedentes, en gran medida esto a la implementación de redes neuronales convolucionales.

En primera medida, los algoritmos de procesamiento de imágenes permiten realizar análisis detallados de las muestras de microalgas mediante técnicas de segmentación y análisis de imágenes. Esto significa que pueden identificar y contar las células de microalgas en muestras complejas, incluso en presencia de otros elementos en el medio de cultivo. Esta capacidad resulta invaluable para monitorear el crecimiento de las microalgas a lo largo del tiempo, así como para optimizar las

condiciones de cultivo, ya que proporciona datos precisos sobre la densidad celular y la distribución de las células en la muestra.

Además, los algoritmos más avanzados emplean técnicas de aprendizaje automático y visión por computadora para extraer características morfológicas y texturales de las células de microalgas con una precisión excepcional. Estas características pueden incluir la forma, el tamaño, la textura y la distribución de las células, entre otros aspectos. Esta información no solo se utiliza para estimar la biomasa de las microalgas de manera más precisa, sino que también proporciona una visión más profunda sobre el estado de salud y la viabilidad de las microalgas en diferentes condiciones ambientales.

Figura 31. Bancos de muestras de algas Microalgas



Phototrophic pigment production with microalgae, Pag 18, consultado en 12 marzo 2024 en <https://edepot.wur.nl/323615>

En *Phototrophic pigment production with microalgae* por Kim J. M. Mulders, se hace uso del análisis digital se examina el metabolismo de pigmentos en microalgas, centrándose en los carotenoides secundarios. Se descubrió que ciertas microalgas, como *Isochrysis aff. galbana T-ISO* y *Chromochloris (Chlorella) zofingiensis*, acumulan carotenoides secundarios en condiciones específicas, como la escasez de nutrientes o de nitrógeno. Además, se encontró que la inhibición de la producción de ciertos carotenoides no aumentó la producción de otros. Se identificó que *C. zofingiensis* alcanzó rendimientos óptimos de carotenoides secundarios y triacilgliceroles bajo ciertas condiciones de cultivo. También se descubrió que la degradación de astaxantina fue mínima cuando *C. zofingiensis* fue reabastecida con nitrógeno. Se sugiere que mejorar el rendimiento de los carotenoides mediante modificaciones genéticas dirigidas puede ser más efectivo que optimizar las condiciones de cultivo [27].

Pudiendo inferir que haciendo uso de análisis digital de imágenes para el control de las condiciones de crianza de las microalgas se puede controlar el color de su pigmentación y así poder utilizar dichos colores dentro de la industria alimenticia para evitar el uso de colorantes artificiales, dicho trabajo cuenta con más de 10 años y en ese punto cuando el *machine learning* estaba siendo poco empleado por su gran cantidad de recursos computacionales, ya la computación influía en la escogencia de las mejores condiciones de cultivo..

7. CONCLUSIÓN

El procesamiento digital de imágenes aplicado a la determinación de biomasa en microalgas *Chlorella* se basa en la capacidad de analizar imágenes microscópicas para extraer información relevante sobre la concentración de células y su viabilidad. Esta técnica se fundamenta en algoritmos y métodos de análisis de imágenes que permiten identificar y cuantificar las células de manera precisa y eficiente. Uno de los aportes más notables del procesamiento digital de imágenes en este contexto es su capacidad para proporcionar una evaluación indirecta de la biomasa mediante la medición de parámetros morfológicos y texturales de las células. Esto incluye características como el tamaño, la forma y la densidad celular, que pueden correlacionarse con la concentración de biomasa y su crecimiento en condiciones específicas de cultivo.

Además, el procesamiento digital de imágenes permite investigar la influencia de las condiciones de cultivo en la concentración de biomasa de las microalgas *Chlorella*. Factores como la temperatura, la concentración de nutrientes y la iluminación pueden afectar significativamente el crecimiento y la productividad de las microalgas. El análisis de imágenes facilita la observación y cuantificación de estos efectos, lo que contribuye a comprender mejor los mecanismos que regulan el crecimiento de las microalgas y a optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de biomasa.

En términos de eficacia, el uso de algoritmos de procesamiento digital de imágenes ha demostrado ser altamente prometedor en la determinación de biomasa de las microalgas *Chlorella*. Estos algoritmos permiten una evaluación rápida, precisa y no destructiva de la concentración de células, lo que facilita la monitorización del crecimiento celular y la optimización de las condiciones de cultivo. Además, la integración de técnicas avanzadas, como el aprendizaje automático y la visión por computadora, ha mejorado aún más la capacidad de estos algoritmos para analizar

imágenes de manera eficiente y extraer información relevante para la estimación de biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. A. D. E. L. A. Mendoza, «Digital De Imagenes Mediante Dispositivos Logicos,» 2009, p. 134.
- [2] C. D. a. J. Barón, «Desarrollo de un prototipo sensor de biomasa basado en algoritmos de procesamiento de imagen,» *Rev. Cienc. y Tecnol. RECyT*, vol. 19, nº 27, pp. 58-62, 2017.
- [3] T. Y. a. R. A. A.-J. S. H. Al-lwayzy, «Biofuels from the fresh water microalgae chlorella vulgaris (FWM-CV) for diesel engines,» *Energies*, vol. 7, nº 3, pp. 1829-1851, 2014.
- [4] L. g. P. Otalora, Herramienta gráfica para la caracterización de cultivos de microalgas basada en redes neuronales artificiales, Almeria: Universidad de Coruña, 2021.
- [5] S. & O. I. Bonilla, La importancia de usar el biovolumen en estudios de fitoplancton y monitoreo ambiental de cianobacterias, Buenos Aires-Argentina: Universidad de Buenos Aires-Argentina, 2023.
- [6] C. E. C.-C. J. S.-V. Martha L. Ortiz-Moreno, Evaluación del crecimiento de la microalga chlorella sorokiniana en diferentes medios de cultivo en condiciones autotroficas y mixotroficas, Villavicencio: universidad de los llanos, 2011.

- [7] C. A. E. Z. A. F. J. Z. B. F. & Z. C. nfante, «Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular.,» *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 3, pp. 159-164., 2012.
- [8] A. C. Nieto Flores, *Evolución del procesamiento digital de imágenes*, Barranquilla - Colombia: Sello Editorial Coruniamericana, 2018.
- [9] P. S. Arce Chirinos, *Procesamiento digital de imágenes: Metodología de tonos de grises y pseudo-color*, Lima - Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, 2006.
- [10] S. E. Herrera Sánchez, *Cultivo de microalga *Chlorella* sp en un fotobiorreactor para la obtención de biodiesel*, Bellavista- Peru: Universidad Nacional del Callao, 2020.
- [11] M. C. A. Escobedo, «Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles,» *Scientia Agropecuaria vol.1no.2 Trujillo* , vol. 12 , nº 2, pp. 265-282, abr./jun 2021.
- [12] A. P. F. E. T. C. H. J.ABALDE, «ruc.udc.es,» 1995. [En línea]. Available: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/25013/Abalde_Julio_1995_Microalgas_cultivo_aplicaciones.pdf?sequence=2&isAllowed=y. [Último acceso: 01 03 2024].
- [13] S. d. P. d. México, «fao.org,» Secretaría de Pesca de México, 2010. [En línea]. Available: <https://www.fao.org/3/ab473s/AB473S02.htm>.

- [14] M. v. Romero H., Diseño de un Sistema de Iluminación Móvil para un Fotobiorreactor, Guayaquil - Ecuador: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL, 2021.
- [15] P. R. V. J. H. E. R. G. B. C. R. Guevara M., «Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella salina*, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela,» *Saber*, vol. 3, 2016.
- [16] S. L. N. J., Efecto de la agitación y alimentación de CO₂ sobre la cinética de crecimiento de un cultivo de microalgas en un fotobiorreactor, Hermosillo, Sonora- mexico: Universidad de Sonora, 2019.
- [17] M. T. M. ., A. D. J. & C. R. O. Arias, «Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos.,» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 18, nº 1, pp. 43-68, 2013.
- [18] J. M. A. S. a. L. C. Y. Piñeros, «Desarrollo y Adaptación de Tecnologías de Producción de Biomasa de Microalgas,» 2018, p. 121–135.
- [19] R. R. K. T. M. a. F. B. I. Rawat, «Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production,» *Appl. Energy*, vol. 103, pp. 444-467, 2013.
- [20] J. U. Grobbelaar, «Microalgal biomass production: challenges and realities,» *Photosynthesis research*, vol. 106, nº 1-2, pp. 135-144, 2010.

- [21] G. R. Y. E. Amaru, «Efecto de la microalga *Chlorella vulgaris* en el manejo de larvas y alevinos de *Orestias luteus* nativa del lago Titicaca, Perú,» *Revista de Investigaciones Altoandinas*, vol. 25, nº 2, pp. 83-89, 2023.
- [22] M. H. S. & H.-J. La, «Microalgae biomass quantification by digital image,» *J Appl Phycol*, 2014.
- [23] M. V. Córdoba-Matson, EVALUACIÓN DE LA BIOMASA DE *Isochrysis galbana* (clon T-ISO), La Paz, México: Cent. Investig. biológicas del noroeste, 2011.
- [24] C. C. ,. D. Alvear M., evaluación del ph y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *dunaliella salina* y *chiorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel, Cartagena-Colombia: Universidad de Cartagena, 2011.
- [25] R. M. E. M. R. Moronta, «Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas,» *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 23, nº 1, pp. 28-43, 2006.
- [26] U. D. ALMERIA, «MICROALGAE,» ual.es, 2021. [En línea]. Available: <https://www2.ual.es/sabana/digitalgae/>. [Último acceso: 12 03 2024].
- [27] K. L. P. M. D. W. R. Mulders, «Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities.,» *Journal of Phycology*, vol. 50, nº 2, pp. 229-242, 2014.

[28] M. A. D. E. L. A. Mendoza, «Digital De Im Agenes Mediante Dispositivos Lógicos,” p. 134, 2009.,» *Rev. Cienc. y Tecnol. RECyT*, vol. 19, nº 27, p. 58–62, 2017.

[29] M. H. S. e. al, «Microalgae biomass quantification by digital image processing and RGB color analysis,» *J. Appl. Phycol*, vol. 27, nº 1, pp. 205-209, 2015.