



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de un protocolo para la obtención de cultivos de microalgas monoespecíficos por citometría de flujo para producción de biomasa

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

Biología

Roberth Andrés Cabrera Romero

Janice Márquez de la Plata Molina

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017-2018

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a toda expresión de Vida y a la Fuerza Universal que la impulsa, sea quien sea o sea lo que sea, me ha inspirado día a día a seguir y a terminar esta carrera tan apasionante. A toda mi familia, especialmente a mi madre, ya que sin su apoyo incondicional nada de esto sería posible. A los amigo/as que hice, porque en ustedes encontré a hermano/as con los mismos valores e ideales, sosteniéndome también cuando el camino no era claro. A ESPOL, especialmente al Dr. Rafael Bermúdez quien nos apoyó con la realización de este trabajo en el laboratorio de Fitoplanctonología junto a la Ing. Viviana Santander, a nuestra tutora Dra. Sofie Van Den Hende y a cada uno de los profesores que dejaron una enseñanza académica y moral en mí. Como mencionó Bernardo de Chartres, si llegamos a ver más y más lejos que ellos, sería porque '*Somos enanos elevados en los hombros de Gigantes*'.

Janice Márquez de la Plata Molina

Agradecido totalmente con el gran esfuerzo que ha hecho mi mamá y mi familia por darme la oportunidad de formarme profesionalmente y por enseñarme que para obtener algo hay que luchar caer y levantarse hasta lograr el objetivo. A los amigos que te dan una mano cuando la necesitas, a los compañeros que te permiten superarte día a día con sus conocimientos, a los educadores por ser una guía en nuestra formación, a ESPOL por abrirnos las puertas a jóvenes que buscamos superarnos. Al Dr. Jorge Rafael Bermudez por la oportunidad y el apoyo para trabajar en el laboratorio de Plancton, a la Dr. Sofie Van Den Hende por su tiempo para la revisión de nuestro trabajo, a la Ing. Viviana Santander por el apoyo en el desarrollo del presente proyecto y a cada persona que aportó con su conocimiento y con su aliento en todo este periodo de formación académica para todo ustedes muchas gracias.

Roberth Andrés Cabrera Romero

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a todas las mujeres y niñas que han decidido y decidirán entrar en este camino sin retorno llamado Ciencia, especialmente a mi ‘estrellita de mar’ Rosa María Molina, una mujer trabajadora y alegre que siempre apoyó incondicionalmente a su única hija, enseñándole a jamás rendirse ante nada ni nadie ya que muchas veces la vi luchar y triunfar muchas batallas tanto por su vida, como por la mía. Desde que abrí los ojos por primera vez, sentí todo el poder y la fuerza de su luz, somos complemento y existo por usted. Esta meta alcanzada es más suya que mía, mamá.

Janice Márquez de la Plata Molina

El presente trabajo lo dedico de una forma muy especial a mi mamá, Maritza a mis abuelitos Vicente y Carmita y mi familia en general, gracias a ellos hoy estoy cumpliendo uno de mis mas grande sueños, el apoyo brindado ha sido inimaginable. A los jóvenes para que busquen la forma de superarse día a día y llegar a ser grandes profesionales y recuerden como dice la letra de una de las canciones de Mago de Oz “llegar a la meta no es vencer, lo importante es el camino y en él, caer levantarse, insistir y aprender”.

Roberth Andrés Cabrera Romero

EVALUADOR DEL PROYECTO

PhD Sofie Van Den Hende
Facultad Ciencias de la Vida
Tutor Proyecto Integrador

MSc. Diego Gallardo
Facultad Ciencias de la Vida
Profesor Materia Integrador

PhD Rafael Bermúdez
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales
Co-Tutor Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me (nos) corresponde exclusivamente; y doy (damos) mi (nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Janice Márquez de la Plata Molina

.....
Roberth Andres Cabrera Romero

RESUMEN

Los métodos convencionales en Ecuador para aislar y cultivar algas no se han dirigido hacia técnicas innovadoras que den resultados más viables en cuanto al cultivo de cepas aisladas mono-específicas. Por eso se realizó un protocolo usando la citometría de flujo para este fin. Se analizaron muestras de aguas estancadas recolectadas de distintos mercados de Guayaquil. Las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSort en tres fases: fase precitométrica, corrida de muestras y sorting celular. Se obtuvieron 4 cepas mono-específicas: *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Choelastrella* sp. Y *Dimorphococcus* sp. Los datos obtenidos en el citómetro se procesaron en el software FlowJo 10.1 y se analizó la densidad poblacional de cada cepa obtenida. Esta técnica de obtención de monocultivos resultó ser eficiente, rápida y no altera la viabilidad del crecimiento celular, ya que obtuvimos un crecimiento estable de los cultivos en el cual se observó que *Chlorella* sp. fue la que más creció.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO.....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA	v
RESUMEN	vi
ÍNDICE GENERAL.....	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tablas.....	9
INTRODUCCIÓN	10
SITUACIÓN DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACIÓN DEL ABORDAJE DEL TEMA	11
DECLARACIÓN DE OBJETIVOS:.....	13
GENERAL.....	13
ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO 1	14
INFORMACIÓN GENERAL.....	14
1. PURIFICACIÓN DE MICROALGAS DE AGUA DULCE PARA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	14
1.1 Microalgas	14
1.1.1 Bioquímica de las microalgas	14
1.1.2 Importancia de las microalgas en la biotecnología	15
1.2 Citometría de flujo y Clasificación o 'Sorting' celular	16
1.2.1 Software Cellquest.....	18
CAPÍTULO 2.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.3. Identificación morfológica de las muestras	20
2.4 Análisis de Citometría	21
2.4.1. Calibración del Citómetro.....	22

2.4.2. Uso del Software.....	23
2.5. Análisis citométrico con muestras de microalgas	24
2.5.1. Preparación de Beads	24
2.5.2. Preparación de la Muestra	24
2.5.3. Corrida de los Beads	24
2.5.4. Corrida de Muestra	25
2.5.5. Sorting Celular	26
2.6. Limpieza del Equipo.....	27
2.7 Procesamiento de Datos en FlowJo 10.1	27
2.8 Análisis de Datos de Crecimiento y conteo celular	27
CAPÍTULO 3.....	28
ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
3. Análisis de Citometría de Flujo	28
Discusión.....	38
Conclusiones	41
CRONOGRAMA	43
BIBLIOGRAFÍA	44

Índice de Figuras

Figura 1.1 Principio de Citometría de Flujo [47]	18
Figura 2.1 Panel de Fluidos del citómetro de flujo Benton Dickinson FACSort	22
Figura 3.1 Análisis de la población general de microalgas medido por clorofila a y tamaño externo de las células.....	29
Figura 3.2 Análisis de <i>Scenedesmus</i> sp. distribución medida por clorofila a FL3H y tamaño de la célula SSCH	30
Figura 3.3 <i>Scenedesmus</i> sp.	31
Figura 3.4 Distribución de <i>Chlorella</i> sp. medida por clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.....	32
Figura 3.5 <i>Chlorella</i> sp.....	32
Figura 3.6 Distribución de <i>Choelastrella</i> sp. medida por los rangos de clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.....	33
Figura 3.7 <i>Choelastrella</i> sp.	34
Figura 3.8 Distribución de <i>Dimorphococos</i> sp. medida por los rangos de clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.	35
Figura 3.9 <i>Dimorphococcus</i> sp.	35
Figura 3.10 Gráfico de crecimiento según los días monitoreados.	37

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Algunos determinantes susceptibles de analizar por citometría de flujo	15
Tabla 3.1 Datos de conteo de células en el citómetro.	36

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN DEL PROBLEMA

La flora y fauna en Ecuador ha sido aprovechada en sus cuatro regiones para realizar estudios sobre los productos y servicios que ofrece esta gran biodiversidad [1]. Pese a esto, no se le ha prestado mayor importancia a la variedad de microorganismos, quienes tienen un gran potencial de interés comercial por sus propiedades que benefician a la industria alimenticia, farmacéutica, nutracéutica, cosmetológica y biotecnológica [2], resaltando de ellos a las microalgas de quienes apenas a nivel mundial, se conoce el 17% de la biodiversidad de las mismas [3]. Aunque A.E.-F. Abomohra et al. [4] mencionaban que las microalgas también serían una buena fuente de bioenergía renovable, Vulsteke et al. [5] y Labrijn et al. [6] sostienen que este enfoque no es tan viable por su baja rentabilidad económica en comparación a otros recursos. Una cosecha de biomasa de microalgas eficiente también es un factor clave para un tratamiento sostenible de aguas residuales [7]. Así lo demuestran el tratamiento por MaB-flocs que también genera ingresos considerables como alimento para la acuicultura y más aún, para la producción de ficobiliproteínas de alta pureza y que se sigue desarrollando actualmente con una viable aplicabilidad [5].

Las microalgas incluyen a sus hábitats el suelo, el agua dulce y los ambientes marinos [8]. Su diversidad en ambientes de agua dulce es influenciada por los parámetros físicos y químicos del ecosistema [9] y en nuestro país ha sido catalogada a partir de prístinos sistemas lacustres de áreas protegidas nacionales [2], aguas termales, salobres y lodos [10]. Sin embargo, existe gran desconocimiento sobre las características de las cepas de microalgas que logran habitar aguas residuales de sectores urbanizados ya que, debido a esto, podrían estas microalgas, tener mecanismos de supervivencia que incluyan compuestos químicos que

sean de gran interés en el campo farmacéutico especialmente [11]. Se hace necesario un análisis más profundo de cada una de estas cepas de microalgas para proveer información de sus procesos evolutivos y respuestas biológicas. Esto es algo que se dificulta, debido a la inexistencia de protocolos que permitan realizar cultivos monoespecíficos de microalgas con métodos innovadores. Muchos de los protocolos convencionales solo se pueden aplicar a ciertas especies [12] y otros tienen un efecto negativo, lo que resulta en un decrecimiento de la viabilidad de las células, retrasando su crecimiento o matándolas [13].

JUSTIFICACIÓN DEL ABORDAJE DEL TEMA

En los últimos años los avances en investigación sobre biorecursos, como las microalgas, ha generado ventajas que han llevado a la producción comercial de las mismas. En la actualidad existen varios estudios [14] [15] [16] que han logrado demostrar la viabilidad y eficiencia económica de las moléculas bioactivas de microalgas para diferentes usos en la industria acuícola, farmacéutica, cosmética, alimentaria y energética [17] [18]. La investigación en este campo debe seguir efectuándose con métodos cada vez más innovadores que busquen generar fuentes nuevas de empleos para satisfacer una demanda cada vez más creciente. La producción mundial anual de biomasa de microalgas se estimó en alrededor de 5000-7500 toneladas, generando ingresos anuales promedio de US \$1,25 billones [19], donde los géneros más comerciales y usados en el mundo han sido Nostoc, Chlorella, Spirulina, Dunaliella, entre otras [20].

Las microalgas encontradas en aguas residuales de Ecuador, al no ser estudiadas a profundidad, generan gran interés ya que al habitar en estas aguas de origen doméstico y del comercio en mercados urbanos, tendrían mecanismos de supervivencia que le permitan desarrollarse interactuando con otros microorganismos que causan problemas de salud pública [21] y

por ende tendrían metabolitos secundarios que inhiban el ataque de estos patógenos, los cuales serían compuestos químicos potenciales para bioprospección [22]. Pero, para aislar estos compuestos, es necesario el previo aislamiento y cultivo viable de las microalgas. Se han desarrollado una variedad de métodos para obtener cultivos puros, tales como: estriados de placa, tratamiento con lisozima y dodecilsulfato de sodio, centrifugación con enjuagues repetidos y aplicación de antibióticos a los cultivos, y a pesar de que estos tratamientos funcionan, muchas de las veces resultan selectivos para ciertas especies de algas, mientras que el tratamiento con resina de triyoduro conlleva a una baja viabilidad durante el crecimiento celular [13].

Por estos motivos nace la necesidad de diseñar un protocolo innovador, basado en la citometría de flujo que aún no se ha implementado en Ecuador, para que pueda ser usado localmente. Este ayudará a obtener cultivos monoespecíficos de diferentes cepas de microalgas a partir de una muestra pluricelular [23] [24] [25], con el fin de obtener metabolitos de interés que no sean producidos por la interacción de dos cepas distintas de microalgas [26]. El mismo permitirá separar físicamente, una a una, las microalgas de una población que se detecten en una muestra de agua y así poder separarlas para producir biomasa a gran escala de cepas monoespecíficas.

DECLARACIÓN DE OBJETIVOS:

GENERAL

Diseñar un protocolo para la obtención de cultivos monoespecíficos de microalgas utilizando citometría de flujo para producción de biomasa.

ESPECÍFICOS

- Recolectar muestras de aguas estancadas en mercados urbanos para su cultivo y crecimiento in vitro.
- Analizar las microalgas recolectadas con microscopio óptico para comparación morfológica y citométrica.
- Separar las comunidades de microalgas usando el citómetro de flujo para obtener cepas monoespecíficas.

CAPÍTULO 1

INFORMACIÓN GENERAL

1. PURIFICACIÓN DE MICROALGAS DE AGUA DULCE PARA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

1.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares, procariotas o eucariotas que pertenecen al fitoplancton, adaptadas a transformar la energía lumínica en energía química cuatro veces más eficientemente que las plantas y que se han adaptado a un espectro extremadamente amplio de ambientes. Usan dióxido de carbono (CO_2) para crecer, produciendo fotoautótróficamente la mitad del oxígeno atmosférico, convirtiéndose en las primeras formadoras de materia orgánica y productoras primarias de la cadena trófica [27]. Tienen una enorme importancia ecológica porque constituyen una gran proporción de la biodiversidad del mundo y son uno de los depósitos más ricos y prometedores de productos naturales [28].

1.1.1 Bioquímica de las microalgas

La presencia de microalgas en una muestra de agua o de cultivo microalgal, se puede estimar mediante la determinación de la concentración de diferentes pigmentos que ellas contienen, realizando una medida espectrofotométrica, según la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) en los Métodos Estándares para el examen de agua y aguas residuales [29].

Los pigmentos concentrados en las microalgas varían ampliamente dependiendo de la fisiología, metabolismo y de factores físico-químicos como nutrientes, luz y la temperatura [28]. Estos consisten principalmente en clorofilas (a, b y c) y carotenoides (carotenos y xantófilas). Estos datos fueron ya estudiados por Clesceri et al. en los métodos estándares de APHA, a través de fórmulas aplicadas en espectrofotometría y el citómetro aplica los aplica con el uso de diferentes láseres como detectores lumínicos para poder clasificar a las células según el pigmento que posean [22]. Se han realizado más estudios con cada uno de estos pigmentos que se detallan en la tabla 1.1.

Tabla 0.1.1 Algunos determinantes susceptibles de analizar por citometría de flujo

Longitud de onda del máximo de absorción (nm)	Pigmentos	Referencia de trabajos realizados
664	Clorofila a	Olson et al. 1986 [30]
647	Clorofila b	Steen et al. 1982 [31]
630	Clorofila c	Miller y Quarles 1990 [32]
510 y 480	Carotenoides	An et al. 1991 [33]
720	Ficoeritirina	Cunnigham, 1990 [34]

1.1.2 Importancia de las microalgas en la biotecnología

Las algas son reservorios de compuestos de alto valor añadido (CAVA'S) que se producen debido a su mecanismo de adaptación al entorno hostil donde prosperan. Estos compuestos, conocidos también como metabolitos secundarios, exhiben varias actividades biológicas que incluyen actividades antiinflamatorias, antidiabéticas, antioxidantes, antitumorales, antihipertensivas y neuroprotectoras [18]. Las potentes actividades biológicas de estos metabolitos secundarios han aumentado la exploración de nuevos fármacos que han ganado mucho interés a lo largo de los años, y lo mismo ocurre con su aplicación para producir alimentos funcionales, suplementos dietéticos, nutraceuticos, conservantes y estabilizadores. Además de esto, las microalgas se están explorando en la biotecnología como un recurso importante y una materia prima para producir biocombustibles y productos de biorrefinería [4].

De igual manera, el uso de biomasa de algas como materia prima podría reducir la presión sobre el uso de plantas verdes para la producción de bioetanol [28]. Por lo tanto, las microalgas son una gran promesa como candidatos dignos de importancia farmacéutica y biotecnológica entre todos los microorganismos.

1.2 Citometría de flujo y Clasificación o 'Sorting' celular

A diferencia de las técnicas microbiológicas, genéticas o bioquímicas estándar, este método proporciona información sobre células individuales usando técnicas físicas y principios básicos de óptica, donde no solo da valores promedio para la población sino más datos de interés [35]. Esta capacidad es muy importante al estudiar la distribución

de células en una población, y da acceso a información que no se puede obtener de ninguna otra manera.

En un citómetro de flujo generalizado [36] [37], las partículas individuales pasan a través de una zona de iluminación, típicamente a una velocidad de 1000 células/s⁻¹ y detectores apropiados, miden la magnitud de un pulso que representa la extensión de la luz dispersa como se muestra en la Fig 1.1.

Las magnitudes de estos pulsos se liberan electrónicamente en "contenedores" o "canales", lo que permite la visualización de histogramas de Número de células vs Número de canal. El ángulo de esta luz va a depender de los diferentes tipos de partículas dispersas que pasen por el flujo, nos dará información sobre las mismas y en casos favorables puede ser selectiva para estos diferentes organismos [38]. Además de esto, y más importante, se pueden agregar fluoróforos apropiados a la suspensión celular (muestra). Estas pueden ser manchas que se unen (o reaccionan con) moléculas particulares como ADN, ARN o proteína, sustratos fluorogénicos que revelan distribuciones en la actividad enzimática, indicadores que cambian sus propiedades en función del pH o, cada vez más, a anticuerpos (u oligonucleótidos) etiquetados con una sonda fluorescente [39].

Las posibilidades están limitadas solo por el ingenio del experimentador y los fluoróforos autofluorescentes son los más usados para la investigación con microalgas, usando como determinantes susceptibles de análisis a la clorofila, la ficoeitrina y a los carotenoides que son pigmentos absorbentes de luz [30] [40] [34] [33]. Estos fluoróforos

autofluorescentes son polímeros sintéticos que forman cuentas de tamaño grande en el orden de nanómetros a micrómetros, como por ejemplo las beads de látex que poseen una enorme gama de tamaños y colores disponibles y estandarizados [41].

Varias descripciones muy útiles de aspectos técnicos de la citometría de flujo [36] [42] [43] [37] [44] [45] [36] y su la aplicación a microorganismos [30] [40] [46] [11], también están disponibles.

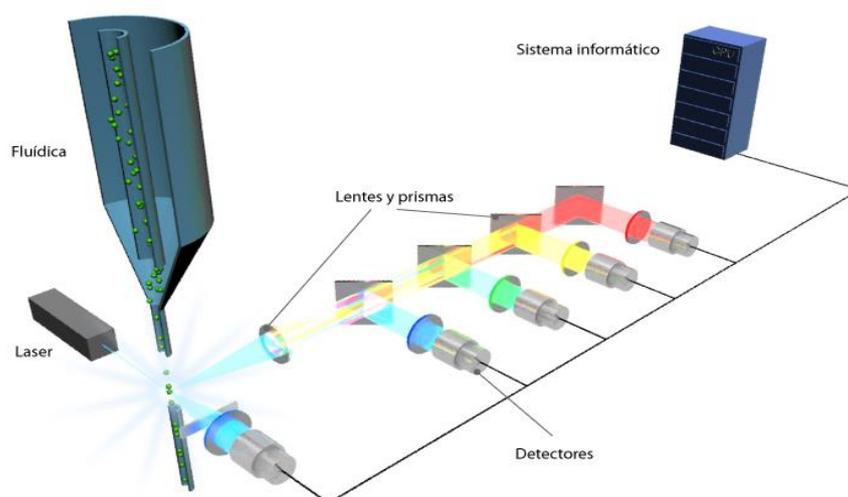


Figura 1.1 Principio de Citometría de Flujo [47]

1.2.1 Software Cellquest

El software CellQuest será el que usaremos para esta experimentación. El mismo permite adquirir y analizar datos

desde un citómetro de flujo en una computadora Macintosh® para crear varios tipos de gráficos, incluidos gráficos de contorno multicolor e histogramas superpuestos. Puede generar datos estadísticos que se puedan relacionar a parámetros físicos o químicos del lugar donde se obtuvo la muestra para realizar gráficos de puntos, histogramas, gráficos de densidad, gráficos 3D y gráficos de contorno. La versátil paleta de herramientas gráficas que posee este programa ayuda a producir documentos con calidad de presentación que pueden ser guardados en un documento de experimento, incluso cerrarlo y restaurarlo todo más tarde [48].

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de las muestras

Las cepas de microalgas fueron recolectadas de aguas estancadas de los alrededores de los mercados de Guayaquil y fueron transportadas al laboratorio de Fitoplancton de la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas y Recursos Naturales (FIMCBOR) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.2 Cultivo de las muestras

Las muestras se cultivaron en Medio Guillard en un fotoreactor con un fotoperiodo 16:8 h/d/n, por 5 días a una temperatura de 25 °C. El medio de cultivo se preparó con 5 µL de una solución de Nitratos y Fosfatos, 0.5 µL de una solución de Micronutrientes y 1 gota de Complejo B como fuente de vitaminas en 100 mL de agua destilada [49]. Se utilizaron frascos de vidrio de 500 mL autoclavados a 120 °C y 20 PSI de presión durante 20 minutos, para el cultivo de las muestras.

La concentración inicial de cultivo fue de 5mL de muestra en 100mL de medio de cultivo. Después de 5 días se hicieron pases de 100mL de muestra a 500 mL de medio de cultivo. Luego de 10, 20 y 30 días se hicieron pasas similares en dos envases de 500 mL de vidrio para cada cepa obteniendo un volumen de cultivo aproximado de 4 L.

2.3. Identificación morfológica de las muestras

Luego de siete días de incubación, las muestras fueron analizadas en un microscopio óptico con un aumento de 600 x con el fin de identificar morfológicamente las diferentes cepas de microalgas. En un estudio previo se realizaron exámenes de identificación genética 18Sr para las microalgas utilizadas en este trabajo. (estudio paralelo que se encuentra en proceso de revisión para publicación).

2.4 Análisis de Citometría

Se analizaron cinco muestras en el citómetro de flujo marca Benton Dickinson FACSort, en el laboratorio de Plancton (FIMCBOR). Previamente a esto se preparó el equipo para su correcto funcionamiento.

Preparación de Equipo

Previo a la utilización del equipo, se revisó los reservorios de agua como se muestran en la Figura 2.1:

'Sheath tank', el cual contiene agua destilada que servirá para el transporte de la muestra.

'Waste tank', el cual debe estar vacío porque recibirá el agua desechada por el equipo.

Se revisó que el citómetro esté conectado al computador. Primero se encendió el citómetro y luego el computador, para que el software instalado en el computador detecte el citómetro encendido. Se prendió la bomba que hará circular el agua (con la válvula de ventilación) y el láser que medirá la fluorescencia en el citómetro del lado lateral derecho del aparato.

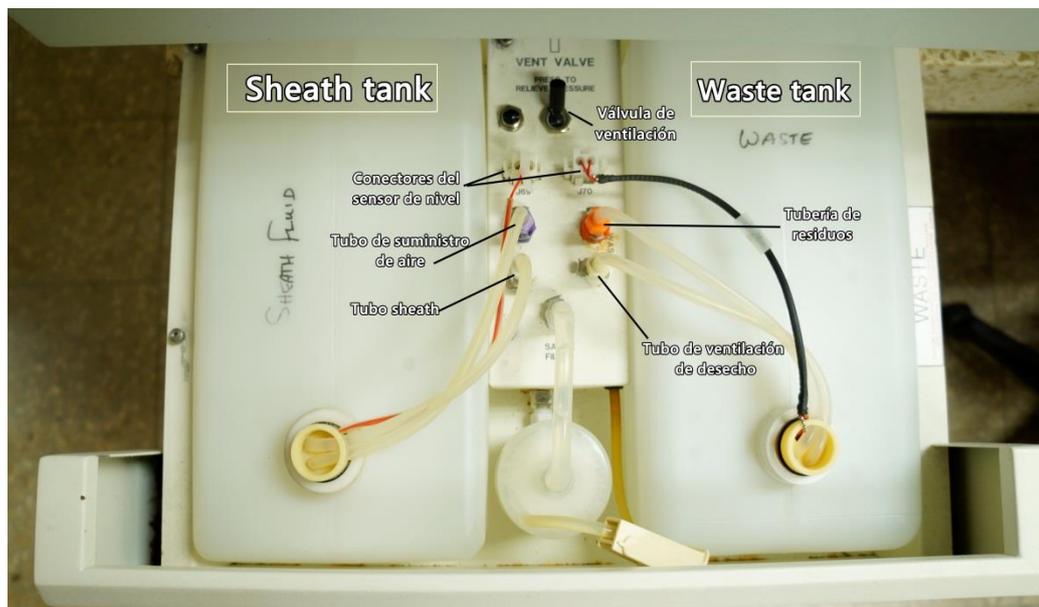


Figura 2.1 Panel de Fluidos del citómetro de flujo Benton Dickinson FACSort

2.4.1. Calibración del Citómetro

Para analizar microalgas se utilizó un flujo medio de agua (30 a 40 $\mu\text{L}/\text{min}$). Para medir el flujo colocamos 1 mL de agua destilada en un vial de 5 ml y se lo dejó correr por 10 minutos en el puerto de inyección de muestra cómo se indica en la Fig. 2.2.

Con el fin de que el flujo se encuentre acorde a la medición que vamos hacer, se deben consumir de 300 a 400 μL en los 10 minutos. Si el flujo estaba más bajo, se aflojó la perilla que permite el paso del flujo ubicada en la parte lateral derecha del equipo y girarla al sentido contrario de las manecillas del reloj. Si el flujo estaba más alto se giraba la perilla en sentido de las agujas del reloj.



Figura 2.2 Ubicación del vial de muestras en el citómetro de flujo

2.4.2. Uso del Software

Se ejecutó el software CELLquest que identificará el citómetro y nos dirigimos a la pestaña “Acquire”. Nos conectamos con el equipo en la opción “Connect to Cytometer” y apareció una ventana comando “Acquisition Control” que nos permitió correr las muestras.

En la Ventana File vamos a la opción Open y seleccionamos la configuración para medir fluorescencia (en nuestro caso fue ADQ_Fluor), esta configuración es la que nos permitió observar los parámetros que determinemos para la medición. Se nos abrió una ventana con los gráficos que mostrarán las mediciones de fluorescencia y tamaño. Abrimos la pestaña “Parameter and Description” que nos permitió guardar los datos que estábamos analizando con las diferentes variables.

En la sección “Cytometer” abrimos la pestaña “Instrument Setting”, donde se seleccionó la configuración que nos permitió medir los

umbrales o rangos de luz en la cual se miden las células. Luego abrimos todas las demás pestañas:

- “Detector Amp.”, nos indica el voltaje de los parámetros que se mide, FSC: tamaño interno y SCC: tamaño externo de la célula; FI1: tamaño promedio, FI2H: Ficoeritrina en un rango de luz de 480 a 580 y FL3H: clorofila en un rango de 600 a 700 dentro del espectro visible.

-“Status” nos indica el estado del equipo mostrando cuando está listo para correr la muestra.

-“Threshold” nos permite manipular las variables que se están midiendo.

2.5. Análisis citométrico con muestras de microalgas

2.5.1. Preparación de Beads

Se utilizaron beads de 1 y 3 μm . Se prepararon en viales de 5 mL: en 1 ml de agua destilada se colocó 1 ml de beads de 1 y 3 μm y se mezclaron en un vórtex.

2.5.2. Preparación de la Muestra

Se utilizó 500 μl de muestra y se colocaron 1 ml de beads de 1 y 3 μm de beads, se mezclaron en el vórtex a una velocidad media, la cual tiene como finalidad no dañar a las células.

2.5.3. Corrida de los Beads

Los beads previamente preparados se insertaron en el puerto de inyección del equipo, verificando que la palanca quede en posición para correr. En el panel de control de fluido se seleccionó “MED” para un flujo medio y en el panel de ejecución se giró la perilla hasta “DRAIN” para sacar las burbujas que se hayan formado. Luego se posicionó la perilla hasta “RUN” para correr los beads como se muestra en la Fig 2.3.

En el computador en la ventana “Acquisition Control” y se seleccionó ‘Ejecutar’ para que se empiecen a analizar los beads. En la ventana de gráficos se observaron las tendencias y el tamaño de hasta donde se podrá analizar las células. Se dejó correr los beads por un minuto y se guardaron en la ventana “Parameter and Description”.



Figura 2.3 Perilla de Mando del Citómetro

2.5.4. Corrida de Muestra

La muestra previamente preparada se insertó en el puerto de inyección del equipo, verificando que la palanca quede en posición para correr la muestra; en el panel de control de fluido se seleccionó “MED” para un flujo medio y en el panel de ejecución se giró la perilla hasta “DRAIN” para sacar las burbujas que se hayan formado. Luego se posicionó la perilla hasta “RUN” para correr la muestra.

En el computador en la venta “Acquisition Control” y se seleccionó ‘Ejecutar’ para que se empiece a analizar la muestra. En la ventana de gráficos se observaron las poblaciones de células de acuerdo a su fluorescencia y tamaño. La muestra se dejó correr por 5 minutos y se registró o se guardó en la ventana de “Parameters and Description”.

2.5.5. Sorting Celular

Para separar las diferentes poblaciones de microalgas, en los gráficos mostrados por el software se seleccionó las regiones que se iban a separar y en la sección de “Cytometer” vamos hasta la pestaña “Sort Setap”. Se abrió una nueva ventana que nos permitió aislar las diferentes regiones seleccionadas. En la pestaña “Sort Gate” se seleccionó la región, en la ventana “Sort Count” se eligió el número de células que fueron separadas. Se ejecutó y la muestra empezó a correr.

Las muestras aisladas salieron por el panel de sorting como se muestra en la fig. 2.4. Aquí se pueden aislar hasta tres distintas regiones al mismo tiempo de una misma muestra.

En el caso de que solo funcione una vía de aislamiento: Para evitar que dos regiones se mezclen en el sorting se hizo pasar aproximadamente 5 mL de muestra de la región en un tubo falcón y esta se desecha. Se hizo pasar el resto de la región, lo que admitió que restos de la región anterior sean evacuados y no se mezclen con la nueva región que se está aislando.

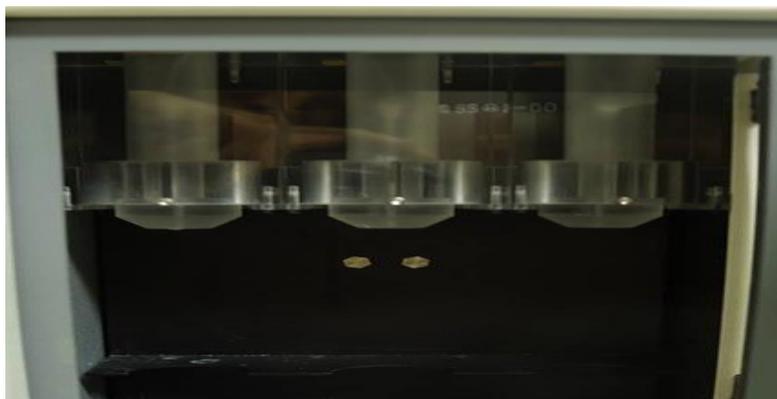


Figura 2.4 Panel de salida de las regiones aisladas de la muestra principal

2.6. Limpieza del Equipo

Para limpiar el equipo se utilizó etanol diluido. Se lo hizo correr acelerando el flujo de inyección de la muestra. Para limpiar los residuos de etanol se hizo otro corrido con agua destilada. En la pantalla de gráficos y en la ventana de “Counter” se mostrará si hay residuos celulares, mientras menor sea el número de estas el equipo está más limpio.

2.7 Procesamiento de Datos en FlowJo 10.1

Los Datos obtenidos del análisis de densidad de poblaciones en el citómetro fueron ejecutados en el software FlowJo en el cual reconstruimos los gráficos y procesamos el número de células contados en el equipo. Los gráficos se formaron con los parámetros de medición de clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.

2.8 Análisis de Datos de Crecimiento y conteo celular

Los datos se obtuvieron de cada análisis de citometría que se hizo, empezamos con un número inicial de sorting de 10000 células. Luego cotamos después de 5 días más es decir a las 10 luego, 20 y 30. Los datos fueron almacenados en Excel y luego se analizaron mediante un gráfico de crecimiento en los días contados.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE RESULTADOS

3. Análisis de Citometría de Flujo

Los gráficos utilizados para analizar los datos en el programa FlowJo se construyeron a partir de Escatergramas o Dot Plot biparamétricos de densidad que correlacionan el tamaño interno de la célula y los rangos de clorofila a. Cada punto en los dot plot representa una célula, que se agruparán formando una población que estarán dentro del rango de los parámetros establecidos. Los ejes de cada gráfico están programados para el conteo del número de células presentes en la muestra dependiendo del tiempo de corrida de ésta, por lo que muestran una escala exponencial.

En la Fig. 3.1. se muestra el análisis de citometría medido por los diferentes rangos de clorofila a y tamaño externo de la célula, en el cual se observan varias poblaciones marcadas por el color celeste. Cada agrupación es una cepa diferente de la población inicial que tienen un rango de luz diferente. En total se marcaron 4 cepas a las cuales se les hizo un sorting.

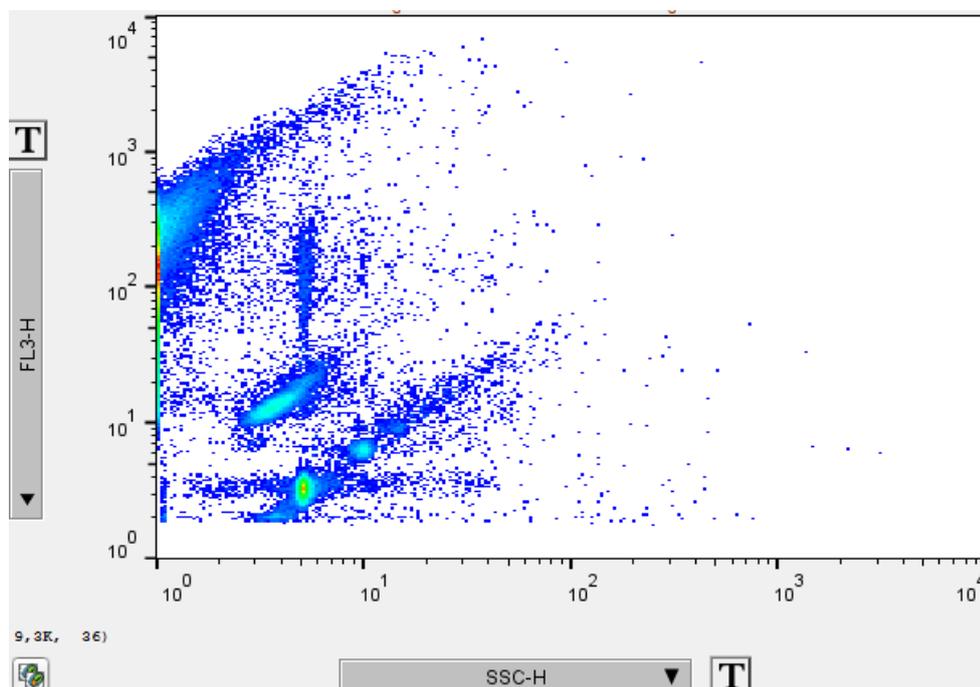


Figura 3.1 Análisis de la población general de microalgas medido por clorofila a y tamaño externo de las células.

Las cepas que fueron aisladas mediante el sorting se cultivaron en medio Guillard durante 5 días para evaluar su crecimiento, observando que estas crecieron con normalidad monoespecíficamente y sin presencia de otras cepas. También es posible observar que hay presencia de ruido el cual están determinados por el color azul en tono más oscuro.

En la imagen se observa en la parte inferior la tendencia de los beads donde el punto con el color verde- azul marca para los beads de 1 y tendencia diagonal están marcados los beads de 3 que no se observan con intensidad ya que no se dejó correr el equipo por más de 5 minutos ya que los datos que se almacenaban eran demasiado pesados para ser transferidos a diskets.

La Fig. 3.2.a muestra la cepa aislada la cual se identificó mediante el análisis morfológico como *Scenedesmus* sp. Observamos una

agrupación muy marcada con un color que se degrada desde amarillo hasta turquesa. Aunque se encontró toda la población de esta cepa bien definida, observamos que los puntos azules oscuros están dispersos y no muestran una tendencia de agrupaciones por tanto los denominamos ruido. En la Fig. 3.2.b se observa el análisis mediante el microscopio de *Scenedesmus* sp. luego de 20 días de cultivo, no se observó presencia de otros microorganismos.

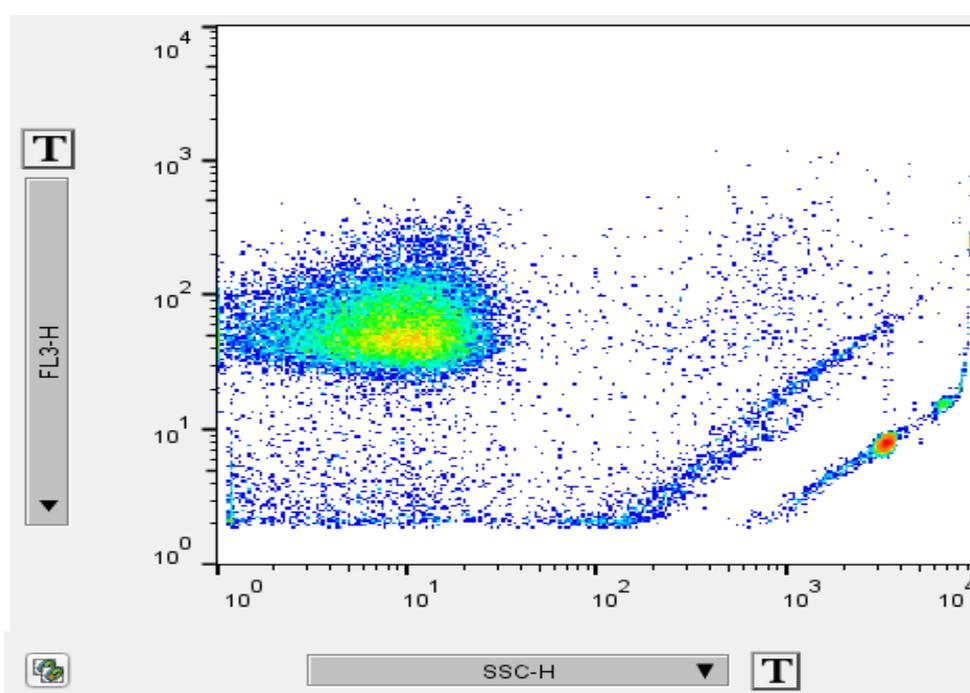


Figura 3.2 Análisis de *Scenedesmus* sp. distribución medida por clorofila a FL3H y tamaño de la célula SSCH

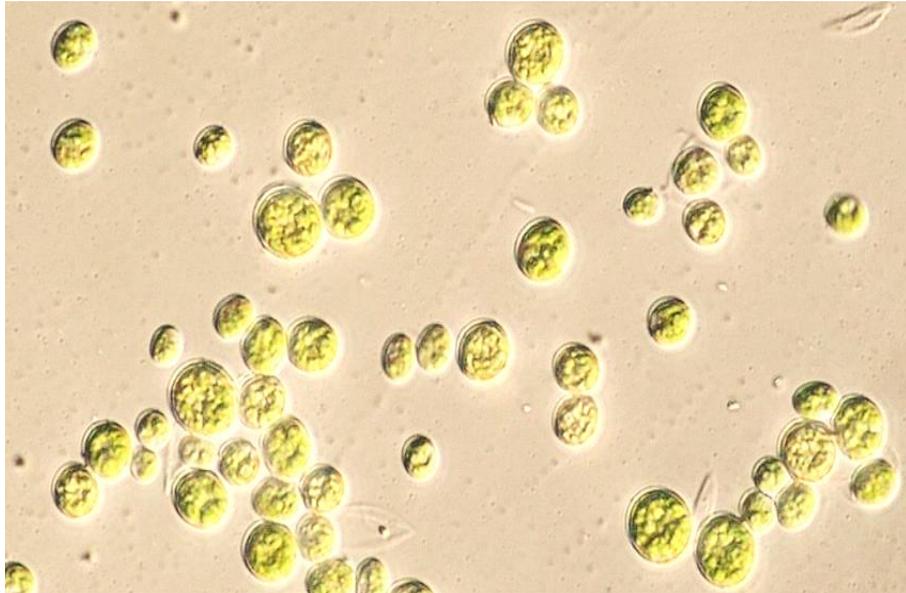


Figura 3.3 *Scenedesmus* sp.

La Fig. 3.3.a muestra la distribución de cepa que se identificó como *Chlorella* sp., medida por los parámetros de clorofila y tamaño externo de la célula. Se observa que esta cepa es pequeña en comparación con las otras. Observamos una agrupación bien definida en la parte inferior derecha de la imagen donde se concentra toda la población. Es posible también observar bien definida la línea de los beads donde se marcan con colores más intensos. En la Fig. 3.3.b se muestra el análisis microscópico de *Chlorella* sp. después de 20 días de cultivo, donde no observó presencia de otros microorganismos.

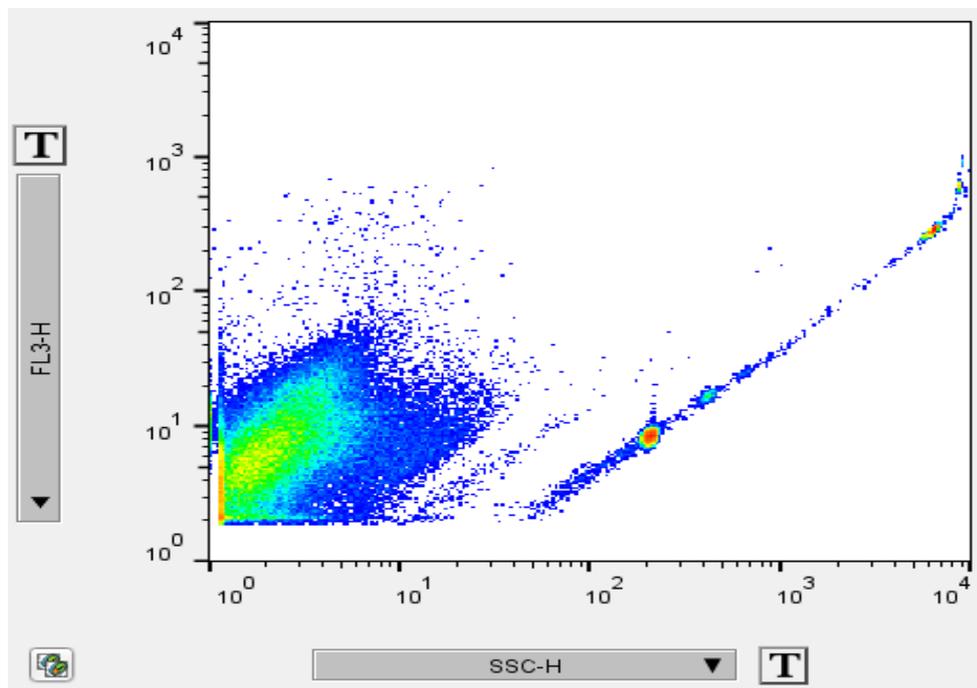


Figura 3.4 Distribución de *Chlorella* sp. medida por clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH



Figura 3.5 *Chlorella* sp.

La Fig. 3. 4.a muestra la distribución de la cepa que se identificó como *Choelastrella* sp. En la imagen se observa una pequeña agrupación en la parte inferior izquierda que se corrió durante más tiempo y se marcó una región bien

definida que no se pudo procesar como imagen ya que pesaba más de la capacidad que se podía guardar en la memoria de los diskets (única unidad de almacenamiento digital que aceptaba este citómetro). Es importante destacar que esta población mostro más dispersión en cuanto a las imágenes es decir la macha de color intenso observada era más grande que en las otras poblaciones. La Fig. 3.4.b muestra el análisis de *Choelastrella* sp. en el microscopio donde no se observa presencia de otros microorganismos.

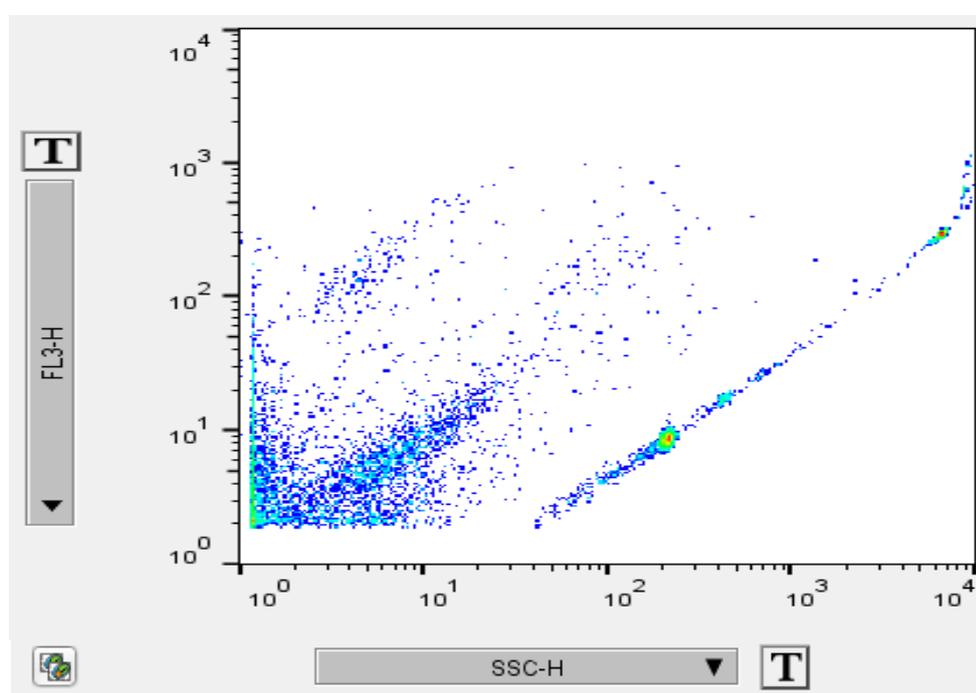


Figura 3.6 Distribución de *Choelastrella* sp. medida por los rangos de clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.



Figura 3.7 *Choelastrella* sp.

En la figura 3.5.a se observa la cepa que se identificó como *Dimorphococcus* sp., esta cepa se distribuye de una forma peculiar en un rango amplio de clorofila a. Hay una región bien marcada que se extiende a lo largo de los ejes. En el momento que se analizaron y contaron casi un millón de células observamos una población bien marcada. Existe la posibilidad de que hubiese células mayores a los tamaños que se determinó como rango a marcar por eso se observa una tendencia a lado de los beads. La Fig. 3. 6.b muestra el análisis microscópico de *Dimorphococcus* sp. donde no se observa crecimiento de otros microorganismos.

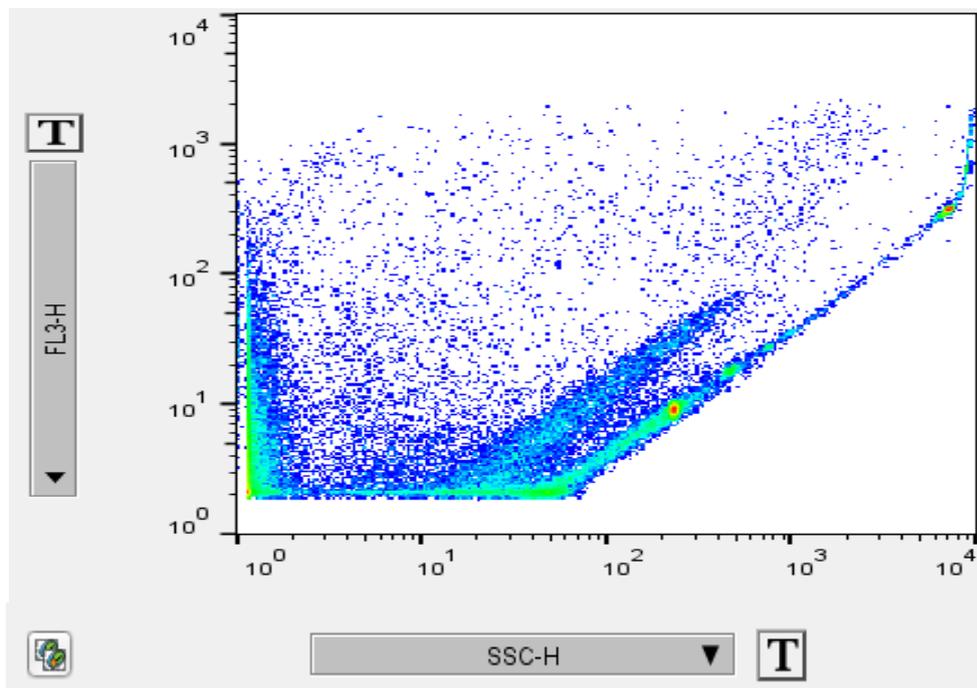


Figura 3.8 Distribución de *Dimorphococcus* sp. medida por los rangos de clorofila a FL3H y tamaño externo de la célula SSCH.

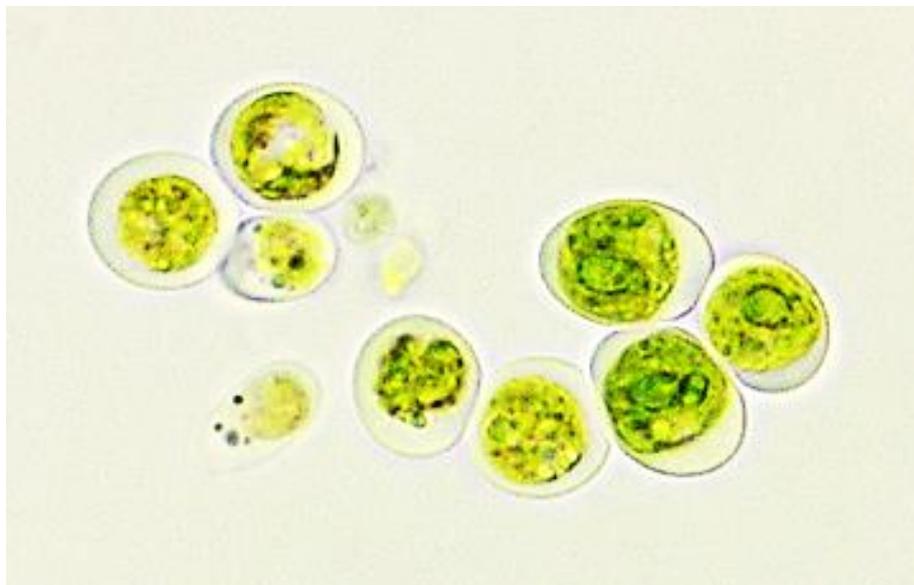


Figura 3.9 *Dimorphococcus* sp.

Se tomaron datos de crecimiento según desde el cultivo inicial de aislamiento que fueron los primeros 5 días, luego 10, 20 y 30. Se contaron el número de células en el citómetro obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 3.1 donde observamos que el crecimiento fue continuo, es decir la célula a medida que tenía nutriente no dejó de multiplicarse.

Tabla 0.1 Datos de conteo de células en el citómetro.

Crecimiento de Cepas Aisladas				
Días/Crecim	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Choelastrella</i>	<i>Dimorphococcus</i>
5	10000	10000	10000	10000
10	22570	24510	23548	21548
15	39854	33854	39123	37245
20	59582	68541	65458	64589
30	152454	185245	165425	114582
Total	284460	626843	303554	247964

Observamos que en el total de células contadas la especie que más creció es *Chlorella* sp. Con un total de 626843 células/10mL. Esto lo observamos mejor en la Fig. 3.6 donde se observa claramente los picos de crecimiento, notando que esta especie es la que tiene los picos de crecimiento tal más alto.

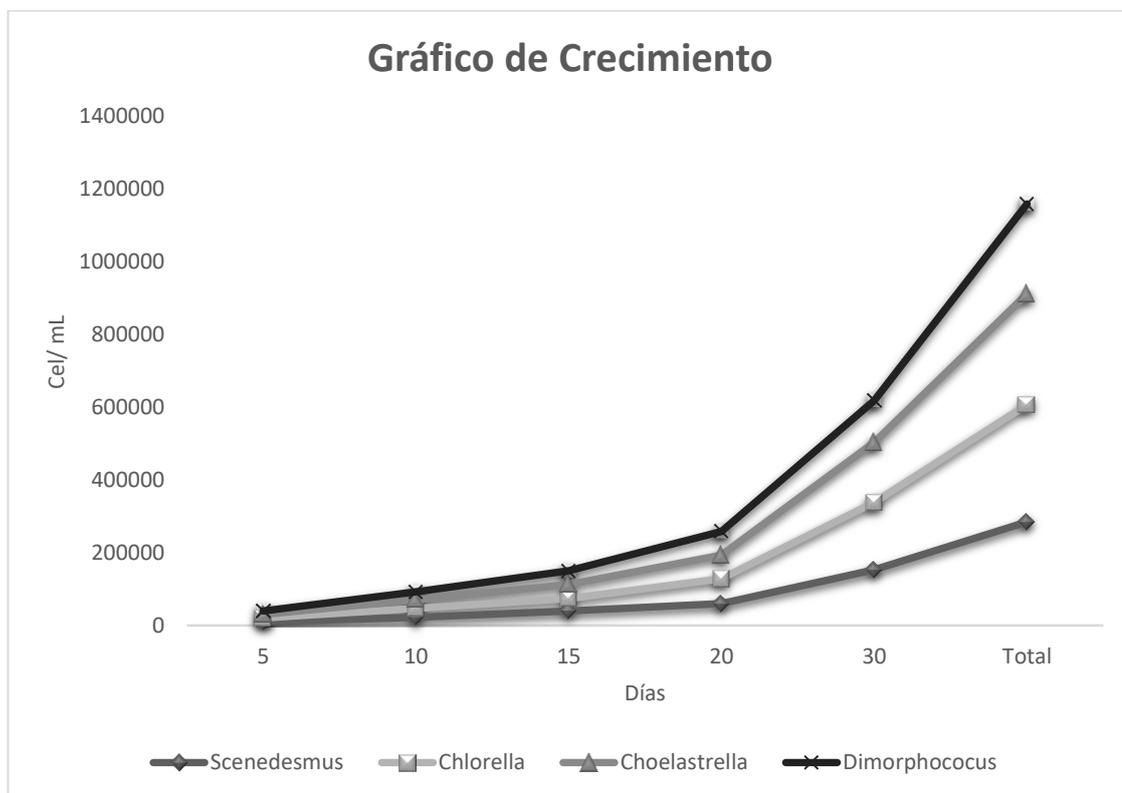


Figura 3.10 Gráfico de crecimiento según los días monitoreados.

Según la tendencia de la línea podemos observar que el patrón de crecimiento es exponencial a lo largo de toda la etapa de crecimiento, esto lo comprobamos si observamos los datos de la tabla 3.1 donde se observa que hay el doble de crecimiento en los días de monitoreo. Sin embargo, debemos recordar que a cada cultivo que se iba realizando se le añadió nuevo medio de cultivo por este motivo no se observan caídas en el crecimiento.

Discusión

La idea básica de contar y medir el tamaño de partículas en solución inició con el contador Coulter desde los años noventa [50], pero la propiedad en la que se basa el principio de este contador es el del volumen celular (el volumen rodeado por la membrana citoplásmica específicamente), siendo más usado por investigadores que estudian el ciclo celular [51]. Aunque el principio de Coulter fue un desarrollo importante, las variables microbiológicas que pueden medirse con el contador Coulter están realmente limitadas al volumen celular, y es con los instrumentos basados en la óptica que se revela el poder del análisis de la citometría de flujo.

Aunque no fue el caso en este trabajo realizado, cabe mencionar que algunos, pero no todos, los reactivos usados en la citometría requieren que las células se fijen o permeabilicen con etanol (70%), formaldehído o glutaraldehído previamente [39].

La citometría de flujo ha venido usándose en las últimas décadas para evaluar poblaciones de microorganismos ya sea para estudios clínicos o biotecnológicos [52] [31]. Muchos estudios han dirigido esta tecnología para la separación de cultivos axénicos con fines investigativos o para la producción de biomasa. De esta manera nos pareció interesante probar el citómetro Bektón Dickinson FacsSort para la producción de cultivos axénicos utilizando muestras de aguas residuales donde la presencia de otros microorganismos como bacterias puede llegar a ser muy alta.

Con el avance tecnológico la citometría de flujo comenzó a abrir grandes oportunidades a la investigación de células microscópicas, ya que esta oferta una excelente técnica para el análisis de cualquier microorganismo [45] [42] [38]. El equipo usado en el presente trabajo abre una serie de oportunidades que se deben aprovechar para la investigación microorganismos,

especialmente para microalgas y explotar ese gran potencial de estas especies.

La citometría de flujo es una técnica alternativa, para estudiar la abundancia y distribución del fitoplancton. Esta técnica permite un análisis rápido y enfocado a la dispersión de luz y fluorescencia que emiten las células [30]. Muchas de las técnicas tradicionales son direccionadas a una sola especie y algunas afectan la viabilidad de otras cepas [53]. Esto dificulta de alguna manera el estudio de microorganismos cuando se quiere analizar las propiedades individuales de cada uno.

Las cepas de algas identificadas y separadas por sorting celular en este estudio presentaron un crecimiento continuo, es decir la viabilidad de estas no fue afectada. Al igual que en el trabajo de [32] se pudo observar un patrón de agrupaciones medidas en colores, que con la ayuda de los anticuerpos o beads que empleamos (clorofilas a y ficoeritrina) se pudo dar un rango en una serie de colores donde se agrupo cada especie. Todas las cepas analizadas presentaron clorofila a, no se obtuvieron cepas que presenten ficoeritrina.

Existe una probabilidad alta de que las cepas aisladas mediante citometría pueden estar igualmente contaminadas con bacterias [37]. Muchas veces las bacterias superan el número de microalgas, y aunque se utiliza la citometría de flujo para producir cultivos axénicos, es difícil eliminar completamente las bacterias asociada, ya que, aunque estas se adhieren a la superficie de las microalgas. A pesar de esto en este trabajo las cepas aisladas no tuvieron problemas de contaminación, en un periodo corto de cultivo alrededor de 20 días. Esto puede ser atribuido a que el citómetro fue limpiado de manera continua con etanol al 90% y agua destilada.

La identificación de cepas a partir de un mismo cultivo fue posible y se logró el aislamiento de cada cepa mediante el sorting celular, como lo muestra el trabajo de [53]. Mediante un análisis microscópico de morfología, se aislaron

4 cepas que se cultivaron por alrededor de 30 días. [23] en su trabajo validaron la identificación y aislamiento de cepas axénicas de especies mediante un análisis de cepas conocidas.

En el trabajo presentado por [52] se mide el crecimiento celular, la viabilidad del cultivo y la producción de biomasa utilizando citometría de flujo y técnicas tradicionales como métodos visuales, químicos y basados en fluorescencia. Obtuvieron grandes resultados con citometría de flujo, que al igual que en este trabajo los cultivos crecieron de forma exponencial y no se detectaron presencias de otras cepas luego del sorting celular. Sin embargo, algunas de las réplicas se lograron contaminar con bacterias, ya que no se contaba con una cámara de flujo laminar para la asepsia adecuada del trabajo.

Las mediciones de concentraciones y diversidad de poblaciones a partir de una muestra, mediante citometría de flujo resultó ser más rápida y fácil, con menos pasos y menos subjetividad que otros métodos [54]. A pesar de esto, se deben tener en cuenta la configuración que se utiliza para realizar las mediciones y la calibración del equipo, ya que con un flujo equivocado la lectura de células mediante el láser puede dar conteos erróneos y distribuciones que no tengan un patrón establecido y sea difícil interpretar los resultados.

Conclusiones

Se logró recolectar muestras de aguas residuales domésticas y de mercados urbanos, se los cultivó en el laboratorio para identificarlos morfológicamente y luego comparar esos resultados con los análisis por citometría de flujo por medio de la clasificación o 'sorting' celular.

La producción de biomasa de microalgas para la producción de ecocombustibles alternativos a combustibles fósiles, compuestos de valor añadido (CAVA's) con aplicaciones químicas o farmacéuticas y como fuente de alimento para una población mundial creciente, sigue siendo uno de los campos más prometedores biotecnológicamente hablando. Sin embargo, todavía queda mucho trabajo por realizar en investigación y desarrollo para seguir descubriendo nuevas cepas de microalgas como fuente renovable.

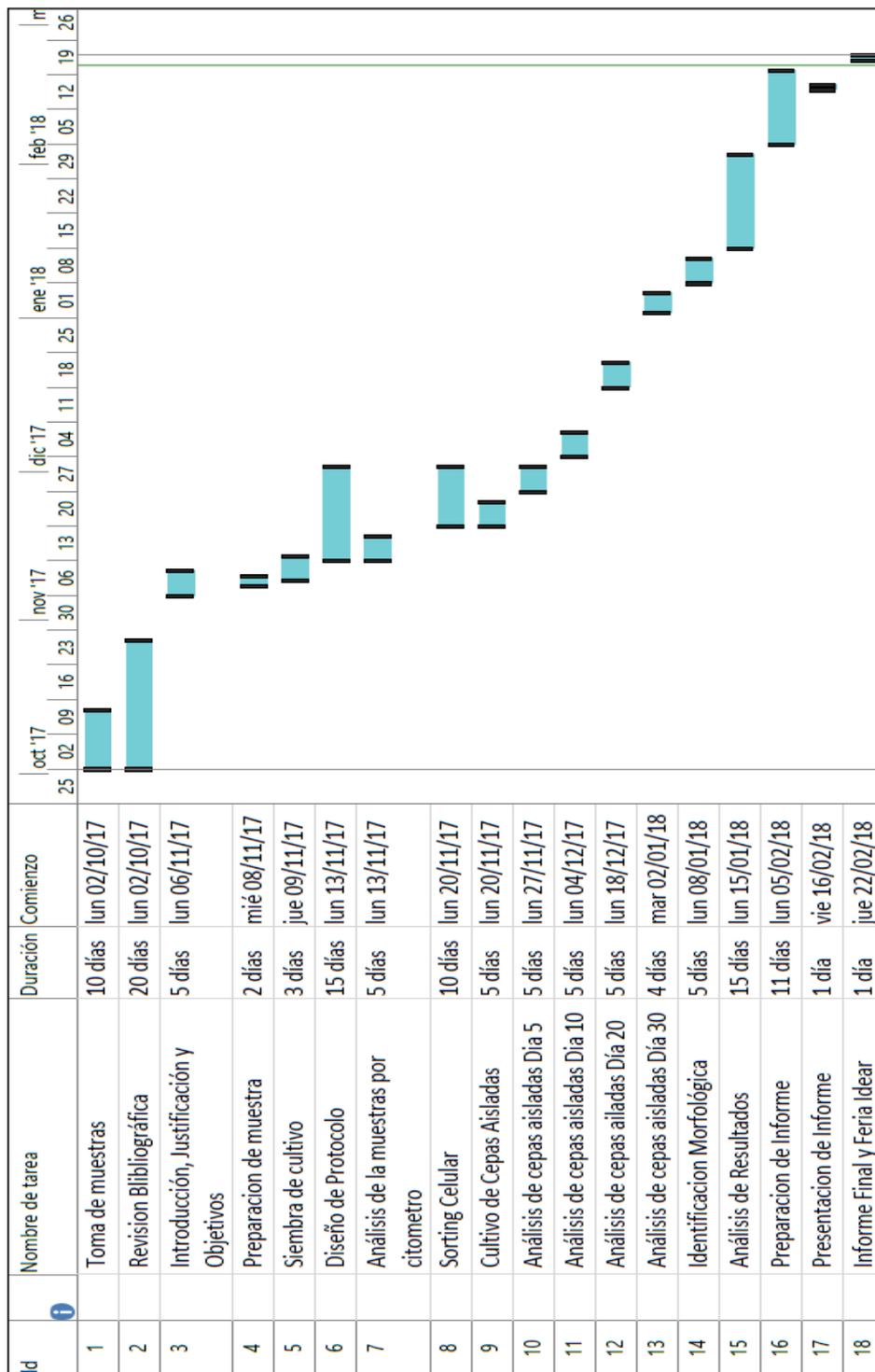
Desarrollar e impulsar esta nueva técnica no solo para uso de ESPOL, sino también para recibir muestras externas nacionales e internacionales da un gran paso para nuevas alianzas interinstitucionales y cooperación con otras organizaciones con líneas de investigación afines.

Se logró diseñar un protocolo para el uso de un equipo nunca antes usado en Ecuador como lo es el citómetro Benton Dickinson FACSort del laboratorio de fitoplancton de ESPOL, descrito en la metodología de este trabajo. Los resultados presentados en este estudio tienen algunas limitaciones de acuerdo a los parámetros utilizados para las mediciones y análisis de poblaciones de

microalgas [65] ya que no se pueden detectar células mayores a 3 μm por que se quedan atrapadas en los conductos de flujo. Sin embargo, en comparación con los métodos tradicionales de aislamiento y monitoreo de cultivos, esta metodología resulta más eficiente para determinar las tendencias generales de abundancia de especies y el aislamiento de las mismas.

Se recomienda al momento de usar el citómetro de flujo, limpiarlo adecuadamente, ya que si no se lo hace mostrara densidades de puntos que darán una interpretación inadecuada de las posibles poblaciones de microorganismo que se encuentren presentes en una muestra. La limpieza se podría hacer con etanol al 90 o 100% y luego con agua destilada. Importante el agua destilada después del etanol, ya que este puede dañar las células que pasen a través de los conductos en el momento del análisis.

CRONOGRAMA



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bravo, Elizabeth *et al.*, “LA BIOSPROSPECCION EN EL ECUADOR,” in *Biodiversidad, bioprospección y bioseguridad*, Anamaría Varea., Quito-Ecuador: ABYA-YALA, 1997, pp. 19–33.
- [2] María Cristina, Guamán Burneo and Nory Paola, González Romero, “Biodiversidad de los Principales Géneros de Microalgas y cianobacterias encontradas en Sistemas Lacustres de Áreas Protegidas de los Andes y Amazonía del Ecuador,” in *Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de agua dulce del Ecuador*, Lucia Re de Guillén., Quito- Ecuador: Quick-Print, 2016, pp. 1–147.
- [3] T. A. Norton, M. Melkonian, and R. A. Andersen, “Algal biodiversity,” *Phycologia*, vol. 35, no. 4, pp. 308–326, Jul. 1996.
- [4] A. E.-F. Abomohra, W. Jin, R. Tu, S.-F. Han, M. Eid, and H. Eladel, “Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 64, pp. 596–606, Oct. 2016.
- [5] E. Vulsteke, S. Van Den Hende, L. Bourez, H. Capoen, D. P. L. Rousseau, and J. Albrecht, “Economic feasibility of microalgal bacterial floc production for wastewater treatment and biomass valorization: A detailed up-to-date analysis of up-scaled pilot results,” *Bioresour. Technol.*, vol. 224, pp. 118–129, Jan. 2017.
- [6] E. Stephens *et al.*, “An economic and technical evaluation of microalgal biofuels,” *Nature Biotechnology*, 01-Feb-2010. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nbt0210-126>. [Accessed: 22-Feb-2018].
- [7] S. Van Den Hende, V. Beelen, G. Bore, N. Boon, and H. Vervaeren, “Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond,” *Bioresour. Technol.*, vol. 159, pp. 342–354, May 2014.
- [8] H. V. Thurman, *Introductory Oceanography*. Merrill, 1978.

- [9] E. G. Bellinger and D. C. Sigee, *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. Wiley, 2010.
- [10] E. Morales, V. Luna, L. Navarro, V. Santana, A. Gordillo, and A. Arévalo, "Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos," *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biológicas*, vol. 34, no. 1–2, pp. 129–149, Aug. 2017.
- [11] H.-W. Yen, I.-C. Hu, C.-Y. Chen, S.-H. Ho, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 166–174, May 2013.
- [12] M. Adamczak and W. odzimierz Bednarski, "Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 22, no. 4, pp. 313–316, Feb. 2000.
- [13] J. Han, S. Wang, L. Zhang, G. Yang, L. Zhao, and K. Pan, "A method of batch-purifying microalgae with multiple antibiotics at extremely high concentrations," *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 79–85, Jan. 2016.
- [14] J. W. Richardson, M. D. Johnson, X. Zhang, P. Zemke, W. Chen, and Q. Hu, "A financial assessment of two alternative cultivation systems and their contributions to algae biofuel economic viability," *Algal Res.*, vol. 4, pp. 96–104, Apr. 2014.
- [15] E. M. Avendaño, R. M. Pérez, and G. S. Rodríguez, "Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio cianobacteria-microalga como acondicionador de suelos," *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biológicas*, vol. 35, no. 1–2, pp. 51–71, Aug. 2017.
- [16] S. Montes, A. María, Y. González Arechavala, and C. Martín Sastre, "Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas," *Rev. An. Mecánica Electr. Periodo 1 Vol. XCI Número Página Inicial 20 Página Final 28*, Feb. 2014.
- [17] F. G. Acién, J. M. Fernández, and E. Molina-Grima, *Biofuels from Algae: Chapter 14. Economics of Microalgae Biomass Production*. Elsevier, 2013.
- [18] O. Pulz and W. Gross, "Valuable products from biotechnology of microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, pp. 635–648, Nov. 2004.

- [19] K. Skjånes, P. Lindblad, and J. Muller, "BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products," *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 4, pp. 405–413, Oct. 2007.
- [20] J. J. Milledge, "Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 10, no. 1, pp. 31–41, Mar. 2011.
- [21] S. W. G. on M. A. SWGMAT, "Standards and Guidelines - Forensic Science Communications - April 2005," *FBI*. [Online]. Available: https://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2005/standards/2005_04_standards02.htm. [Accessed: 22-May-2017].
- [22] "OMICS International : eBooks :: Potential Applications of Microalgae in Wastewater Treatments." [Online]. Available: <https://www.esciencecentral.org/ebooks/ebookchapter/potential-applications-of-microalgae-in-wastewater-treatments-1027/1>. [Accessed: 22-Feb-2018].
- [23] G. T. Peniuk, P. J. Schnurr, and D. G. Allen, "Identification and quantification of suspended algae and bacteria populations using flow cytometry: applications for algae biofuel and biochemical growth systems," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 1, pp. 95–104, Feb. 2016.
- [24] C. W. Sensen, K. Heimann, and M. Melkonian, "The production of clonal and axenic cultures of microalgae using fluorescence-activated cell sorting," *Eur. J. Phycol.*, vol. 28, no. 2, pp. 93–97, Jun. 1993.
- [25] J. Day, U. Achilles-day, S. Brown, and A. Warren, "Cultivation of algae and protozoa.," *Man. Environ. Microbiol.*, 2007.
- [26] E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F. G. Ación Fernández, A. Robles Medina, and Y. Chisti, "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics," *Biotechnol. Adv.*, vol. 20, no. 7, pp. 491–515, Jan. 2003.
- [27] S. Kjelleberg, B. Norkrans, H. Löfgren, and K. Larsson, "Surface balance study of the interaction between microorganisms and lipid monolayer at the air/water interface," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 609–611, Apr. 1976.

- [28] Applied and Environmental Microbiology Research Group (AEMREG), University of Fort Hare, Alice, South Africa *et al.*, "Algae as an Important Resource of Natural Products of Medical and Biotechnological Importance: A Mini-Review," *Trop. J. Nat. Prod. Res.*, vol. 1, no. 5, pp. 188–190, Nov. 2017.
- [29] E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition*, 22nd ed., vol. 2. USA: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2010.
- [30] R. J. Olson, D. Vaultot, and S. W. Chisholm, "Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry," *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 32, no. 10, pp. 1273–1280, Oct. 1985.
- [31] A. Alvarez-Barrientos, J. Arroyo, R. Canton, C. Nombela, and M. Sanchez-Perez, "Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 167–195, Apr. 2000.
- [32] J. S. Miller and J. M. Quarles, "Flow cytometric identification of microorganisms by dual staining with FITC and PI," *Cytometry*, vol. 11, no. 6, pp. 667–675, Jan. 1990.
- [33] G.-H. An, J. Bielich, R. Auerbach, and E. A. Johnson, "Isolation and Characterization of Carotenoid Hyperproducing Mutants of Yeast by Flow Cytometry and Cell Sorting," *Nat. Biotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 70–73, Jan. 1991.
- [34] A. Cunningham, "Fluorescence pulse shape as a morphological indicator in the analysis of colonial microalgae by flow cytometry," *J. Microbiol. Methods*, vol. 11, no. 1, pp. 27–36, Feb. 1990.
- [35] E. Boye and A. Løbner-Olesen, "Flow cytometry: illuminating microbiology.," *New Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 119–125, Feb. 1990.
- [36] Myron R. Melamed, Tore Lindmo, and Mortimer L. Mendelsohn, *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley, 1994.
- [37] H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, 2005.
- [38] D. Lloyd, *Flow Cytometry in Microbiology*. Springer Science & Business Media, 2013.

- [39] D. B. Kell, H. M. Ryder, A. S. Kaprelyants, and H. V. Westerhoff, "Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures," in *Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms*, Springer, Dordrecht, 1992, pp. 145–158.
- [40] B. R. Robertson and D. K. Button, "Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry," *Cytometry*, vol. 10, no. 1, pp. 70–76, Jan. 1989.
- [41] "Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy)." [Online]. Available: <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-confocales/metodos-confocales/fcs/>. [Accessed: 22-Feb-2018].
- [42] K. A. Muirhead, P. K. Horan, and G. Poste, "Flow Cytometry: Present and Future," *Nat. Biotechnol.*, vol. 3, no. 4, pp. 337–356, Apr. 1985.
- [43] M. V. Dilla, R. G. Langlois, D. Pinkel, D. Yajko, and W. K. Hadley, "Bacterial characterization by flow cytometry," *Science*, vol. 220, no. 4597, pp. 620–622, May 1983.
- [44] M. G. Ormerod, *Flow Cytometry: A Practical Approach*. OUP Oxford, 2000.
- [45] *Flow Cytometry*. Academic Press, 1991.
- [46] T. Scheper, B. Hitzmann, U. Rinas, and K. Schügerl, "Flow cytometry of *Escherichia coli* for process monitoring," *J. Biotechnol.*, vol. 5, no. 2, pp. 139–148, Apr. 1987.
- [47] D. M. Carmen Vicente; Martos, Mari, "Citometría de flujo: midiendo células - Biotech Spain," *Biotech*, 2011. [Online]. Available: https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra. [Accessed: 23-Feb-2018].
- [48] *Immunology of Infection*. Academic Press, 2010.
- [49] Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, "Colecciones | IBVF," *IBVF*, 2012. [Online]. Available: https://www.ibvf.us-csic.es/colecciones_cultivo. [Accessed: 22-Feb-2018].

- [50] C. M. Harris and D. B. Kell, "The estimation of microbial biomass," *Biosensors*, vol. 1, no. 1, pp. 17–84, Jan. 1985.
- [51] C. Em, *Magnifying The Cell Division*. Cee Emm.
- [52] E. Günerken, E. D'Hondt, M. Eppink, K. Elst, and R. Wijffels, "Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling," *Algal Res.*, vol. 25, pp. 25–31, Jul. 2017.
- [53] D. Marie, F. Le Gall, R. Edern, P. Gourvil, and D. Vaultot, "Improvement of phytoplankton culture isolation using single cell sorting by flow cytometry," *J. Phycol.*, vol. 53, no. 2, pp. 271–282, Apr. 2017.
- [54] P. von Dassow, G. van den Engh, D. Iglesias-Rodriguez, and J. R. Gittins, "Calcification state of coccolithophores can be assessed by light scatter depolarization measurements with flow cytometry," *J. Plankton Res.*, vol. 34, no. 12, pp. 1011–1027, Dec. 2012.