

Evaluación de la correlación existente entre densidad celular y densidad óptica de microalgas marinas

Resumen—

En este estudio, se estableció la correlación existente entre la densidad celular y la densidad óptica que presentan los cultivos de microalgas marinas. Esto como resultado de los extensos periodos de tiempo que involucra la aplicación de un método de conteo directo, como las lecturas de la cámara de Neubauer en un microscopio, o un método indirecto a través de la medición de clorofila. Para ello se realizaron mediciones diarias de densidad celular en el microscopio con la cámara de Neubauer y absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-Visible en 6 especies de microalgas durante 30 días. Al graficar los datos de densidad celular contra los de absorbancia y al aplicar un ajuste lineal, se obtienen para cada una de las especies, las ecuaciones que describen su dinámica poblacional en el tiempo, así como sus respectivos coeficientes de determinación (R^2). Este valor permitió determinar la confiabilidad de las expresiones establecidas.

D. A. Alfaro, A.C. Gómez, y M.D. Rovira

*Departamento de Ingeniería Procesos y Ciencias Ambientales, Universidad
Centroamericana José Simeón Cañas
mroviraca.edu.sv*

Índice de términos— Absorbancia, correlación, densidad celular, microalgas.

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares que se localizan en diversos hábitats como aguas marinas, aguas dulces o aguas residuales y poseen la capacidad de fijar el dióxido de carbono y almacenar energía solar, contribuyendo con el 50% del proceso fotosintético del planeta. Su eficiencia en este proceso es cuatro veces superior que la de las plantas [1].

Con el fin de conocer la densidad de la biomasa con la que se cuenta, es decir, la cantidad de células de microalgas contenidas en un mililitro de medio de cultivo, se recurre a métodos directos de conteo como la cámara de Neubauer o Hematocitómetro en el que con la ayuda de una micropipeta se deposita una gota de muestra en la cámara, que al observarse en el microscopio permite cuantificar el número de células por cuadrante (Ver Fig. 1).

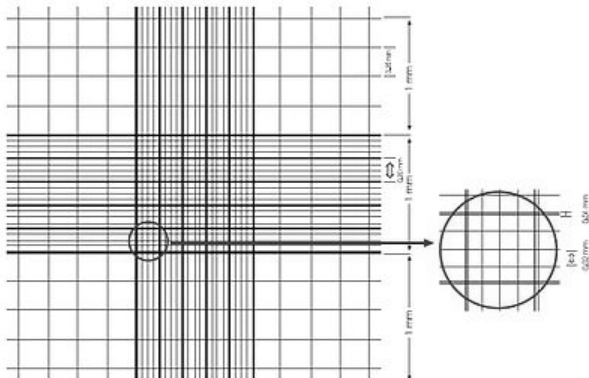


Fig. 1 Cuadrantes vistos en el microscopio de la cámara de Neubauer.

También existen métodos indirectos de conteo como el uso de un espectrofotómetro UV para el registro de los cambios de densidad óptica de los cultivos. En algunos casos, la biomasa microalgal puede estimarse a partir de la concentración de la clorofila a que se encuentra presente en todas las especies de microalgas. La determinación del contenido de clorofila a (mg/L), requiere de la aplicación de métodos de espectrofotometría o fluorometría, y del uso de una correlación empírica acorde al tipo de solvente utilizado en el análisis [2].

El resultado dependerá de factores como el tipo cultivo a examinar y los nutrientes suministrados al medio [3]. La concentración de clorofila a de la muestra, se relaciona con su respectiva densidad celular a través de una curva de calibración, la cual ha sido elaborada a partir de valores de clorofila a medidos a diluciones de una muestra de microalgas de densidad conocida [4].

Por otro lado la concentración celular puede ser estimada de forma indirecta haciendo uso de la densidad óptica de cada cultivo. Para ello, es necesario calibrar con anterioridad el equipo. La principal ventaja de este método es la rapidez con la que se efectúan las lecturas a determinadas longitudes de onda, sin embargo, la contaminación a la que esta expuesta la muestra (basura, residuos) da lugar a lecturas erróneas, lo que hace que este método sea evitado [5]. Sin embargo para dar seguimiento al crecimientos de microalgas donde el cultivo está libre de contaminación podría ser una alternativa interesante.

Para determinar la densidad celular del cultivo a partir de la densidad óptica, deben realizarse curvas de calibración para cada especie que se desee medir. Estas se construyen

graficando la absorbancia medida frente a la cantidad de microalgas presentes en la muestra [5, 6].

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la efectividad de la correlación establecida entre el método directo de conteo convencional y las técnicas de espectrofotometría.

II. MATERIALES Y METODOS

Para la evaluación de la correlación entre la densidad celular de microalgas y su absorbancia se utilizaron 6 especies de microalgas marinas: *Chaetoceros Calcitrans*, *Tetraselmis sp.*, *Pavlova Lutheri*, *Nannochloropsis sp.*, *Chaetoceros Gracilis* e *Isochrysis Galbana*, cuyas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), y se cultivaron haciendo uso del medio F/2 de Guillard (Ver Tabla I), en balones con capacidad de 1 L durante 30 días a una temperatura constante de 25 °C, con iluminación permanente a 1,730 luxes y empleando aire como fuente de carbono a partir de bombas de aire Atman At-301 (Ver Fig. 2). La concentración de microalgas necesaria para servir como inóculo fue de 75,000 células/ml. El agua de mar utilizada en el medio de cultivo se preparó a partir de agua destilada y sal cruda a una salinidad de 30 ups (30 g sal/L de agua).

TABLA I. MEDIO F/2 DE GUILLARD

Solución	Reactivo
I (Nitratos/Fosfatos)	Nitrato de Sodio (NaNO_3) Fosfato de Sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
II (Silicatos)	Silicato de Sodio ($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)
III (Trazas de metales)	Sulfato Cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Cloruro de Manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Molibdato de Sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) EDTA disódico (Na_2EDTA) Cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
IV (Vitaminas)	Piridoxina (B_6) Cianocobalamina (B_{12}) Tiamina (B_1)

Fuente: [7]

Debido a la cantidad de tiempo requerido para el recuento celular directo realizado con la Cámara de Neubauer, se estableció la correlación existente entre la absorbancia y la densidad celular de los cultivos, que permitiera medir con rapidez y facilidad su comportamiento a través del tiempo. Para este fin, se realizó el cultivo a nivel intermedio de todas las especies microalgales.

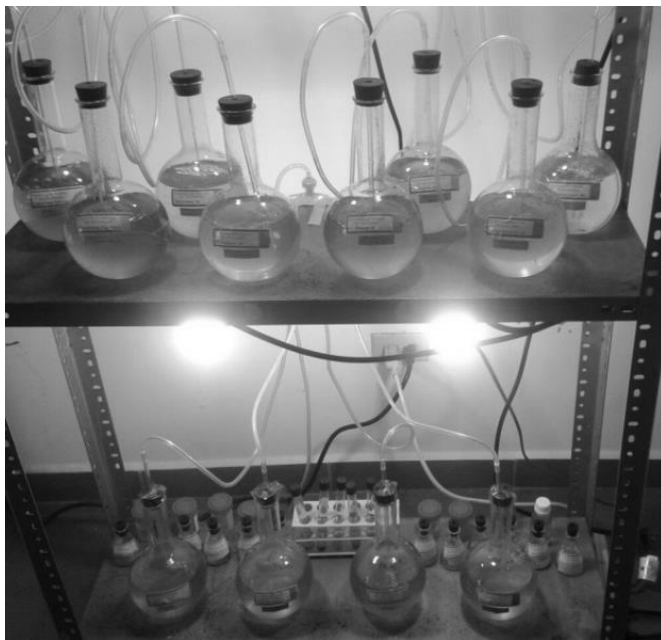


Fig. 2 Cultivos intermedios para el experimento.

Durante 30 días se midió en cada uno de ellos, el crecimiento celular de los microorganismos, a través del conteo directo con el Hematocitómetro en el que con la ayuda de una micropipeta con capacidad de 10-100 μL se colocó una gota de muestra entre el cubre objeto y la cámara de conteo, dejándola reposar durante 2 minutos. Con la ayuda del microscopio NOVA IN833 se cuentan todas las células contenidas en cada uno de los seis cuadrantes, excluyendo las células del lado izquierdo y superior (Ver Fig. 2). Se eliminan el valor máximo y mínimo de los 6 cuadrantes y se promedia el conteo de los 4 cuadrantes restantes, este resultado se multiplica como se muestra en la Ecuación 1 para obtener la densidad de células/mL [7].

$$\begin{aligned} \text{Densidad de células/ml} = \\ \text{Promedio de conteo} * 258 \\ * 10000 (\text{constante para convertir a 1 ml}) \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Mediante barridos espectrales, se determinó para cada especie, la longitud de onda en la que se reportaba el pico más grande de absorbancia. Este valor estableció, la longitud de onda a la que se realizarían las lecturas. El rango empleado para estos barridos comprendía entre 200 y 700 nm. El registro de sus absorbancias se realizó con el espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50. Tanto los conteos como las mediciones se hicieron por duplicado.

Con los datos obtenidos, se elaboraron curvas de calibración, a las cuales se les realizó un análisis de regresión lineal. De esta forma, se obtuvieron las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada especie. Estas ecuaciones servirían para conocer la concentración en células/mL de los balones, utilizando la lectura de absorbancia como variable independiente, utilizando el valor de su coeficiente de determinación (R^2) como criterio de evaluación de su linealidad.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla II detalla los valores de longitudes de onda máximos registrados para cada especie de microalga durante el barrido espectral.

TABLA II. PICOS DE LONGITUDES DE ONDA PARA MICROALGAS

Especie	Longitud de onda máxima (nm)
Isochrysis Galbana	686
Pavlova Lutheri	690
Tetraselmis sp.	672
Nannochloropsis sp.	690
Chaetoceros Calcitrans	690
Chaetoceros Gracilis	680

Fuente: (elaboración propia, 2015)

Las gráficas que se observan en las Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 describen las curvas de calibración de cada especie.

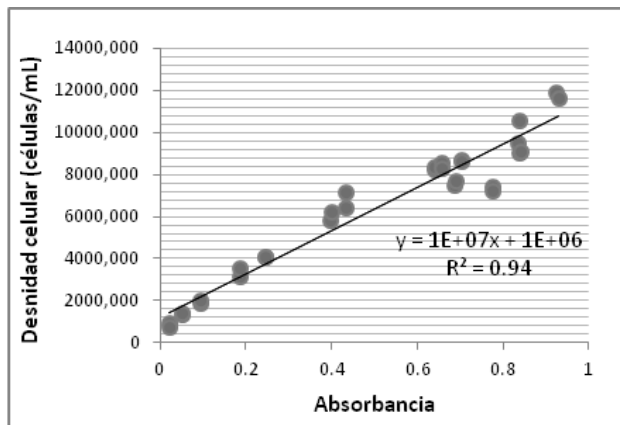


Fig. 3 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Isochrysis Galbana*.

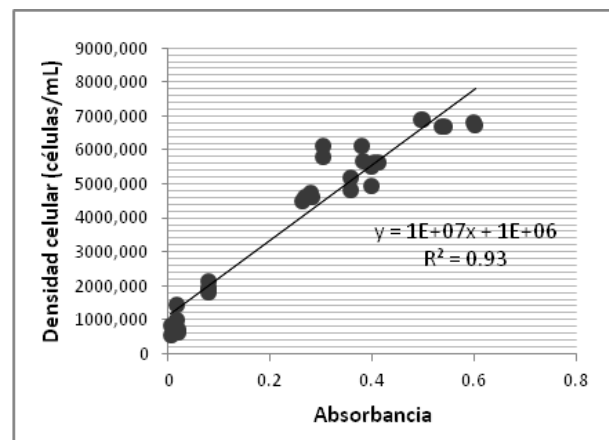


Fig. 4 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Pavlova Lutheri*

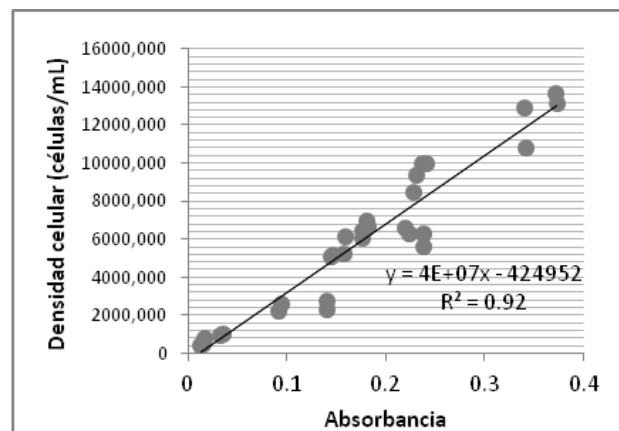


Fig. 5 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Tetraselmis sp*

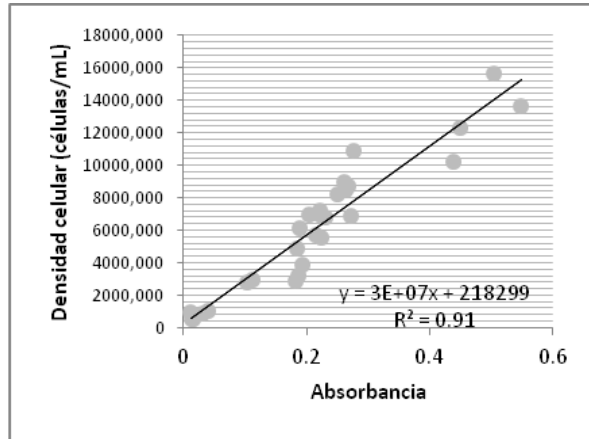


Fig. 6 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Nannochloropsis sp*

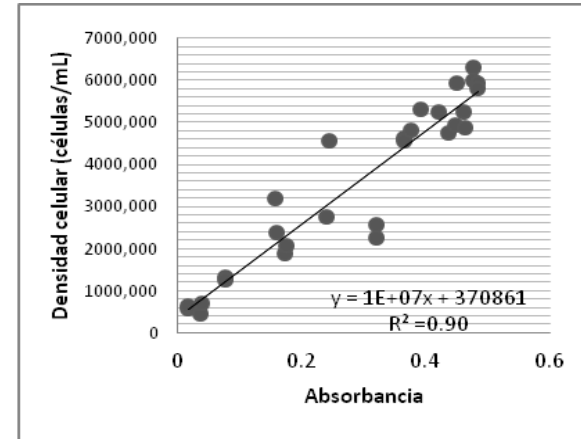


Fig. 8 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Chaetoceros Gracilis*.

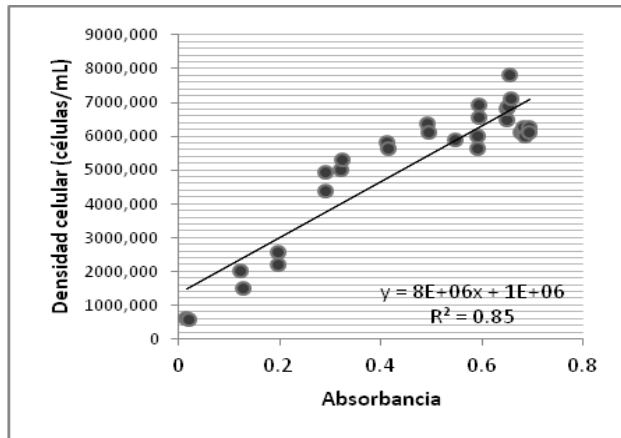


Fig. 7 Relación absorbancia-densidad celular de la microalga *Chaetoceros Calcitrans*.

En las gráficas anteriores se observa que efectivamente, existe una relación lineal entre la densidad celular de las microalgas y su absorbancia en el tiempo. Esta relación puede encontrarse mediante el ajuste lineal de los valores obtenidos, y resulta más evidente para las algas verdes *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.*, y para las microalgas dorada *Pavlova Lutheri* e *Isochrysis Galbana* en comparación con las diatomeas *Chaetoceros Calcitrans* y *Chaetoceros Gracilis*. En los primeros días de los cultivos de diatomeas, aunque sus densidades incrementan, los valores de absorción registrados se mantienen casi constantes; esto se debe a que a diferencia de las algas verdes y las algas doradas, las diatomeas adquieren su coloración característica rápidamente, la cual no cambia mucho en los días consecutivos.

En la Tabla 2 se presentan las ecuaciones del ajuste lineal aplicado a cada gráfica, además de sus respectivos coeficientes de determinación.

TABLA II. RESULTADOS DEL AJUSTE LINEAL DE LOS CULTIVOS

Especie	Ecuación	Coefficiente de determinación (R ²)
<i>Isochrysis Galbana</i>	$Y=1 \times 10^7 \times 1 \times 10^6$	0.94
<i>Pavlova Lutheri</i>	$Y=1 \times 10^7 \times 1 \times 10^6$	0.93
<i>Tetraselmis sp.</i>	$Y=4 \times 10^7 \times 424952$	0.92
<i>Nannochloropsis sp.</i>	$Y=3 \times 10^7 \times 218299$	0.91
<i>Chaetoceros Calcitrans</i>	$Y=8 \times 10^6 \times x + 1 \times 10^6$	0.85
<i>Chaetoceros Gracilis</i>	$Y=1 \times 10^7 \times 370861$	0.90

Fuente: (elaboración propia, 2015)

Al obtener la ecuación de cada recta que relaciona a la absorbancia con la densidad celular podemos observar que el coeficiente de determinación (R²), en la mayoría de microalgas es muy alto, esto representa la existencia de una relación entre los valores de absorbancia y densidad celular. Si el coeficiente de determinación es alto, como en la microalga *Isochrysis Galbana*, los valores se encuentran muy relacionados entre sí y podría utilizarse la ecuación de la recta para calcular la absorbancia en base a la densidad o viceversa, pero en el caso de la microalga *Chaetoceros Calcitrans*, cuyo coeficiente de determinación resultó el más bajo, la ecuación de recta

obtenida no es confiable, debido a la baja relación entre su absorbancia y su densidad.

IV. CONCLUSIONES

El uso de mediciones de absorbancia en el tiempo por medio de espectrofotometría, es un método que representa eficientemente el crecimiento de un cultivo de microalgas y que puede ser utilizado en muestras de cultivo puro.

Cambios en las densidades ópticas de un cultivo, se traducen en incrementos o disminuciones de la densidad celular de los microorganismos., sin embargo esta relación depende de la especie. Esto se comprobó a partir de la elaboración de curvas de calibración para cada una de las especies, en las que el mayor coeficiente de determinación obtenido fue 0.94, correspondiente a la especie *Isochrysis Galbana* y el menor fue de 0.85 para *Chaetoceros Calcitrans*.

V. RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen las contribuciones O. Osegueda por su apoyo en la realización de este trabajo.

VI. REFERENCIAS

- [1] Ramara, R., Dussade, N., Whangchai, N., & Unpaprom, Y. (2014). Microalgae biomass as an alternative substrate in biogas. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 15-19.
- [2] Henriques, M., Silva, A., & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 586-593.
- [3] FAO. (Abril de 1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Brasilia: Documentos de la FAO. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [4] Held, P. (2011). Monitoring of Algal Growth Using their Intrinsic Properties. *Biofuel Research*, 1-5.
- [5] Sacasa, C. (2013). Batch and continuous studies of *Chlorella vulgaris* in photobioreactors. Ontario: University of Western Ontario.
- [6] Romo, A. K. (2002). Manual para el cultivo de microalgas: Memoria técnica para el título de biólogo marino. La Paz: Universidad Autónoma de Baja California.
- [7] CENDEPESCA. (2009). Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de moluscos bivalvos. Puerto El Triunfo: CENDEPESCA/MAG.