

Uso del método espectrofotométrico para la cuantificación celular de microalgas marinas de uso en la acuicultura

Ruth M. Alejos Cabrera^a ; Gheraldine A. Ynga Huamán ; Wilmer A. Gaspar Reyes 

Laboratorio de Alimento Vivo, Instituto del Mar del Perú (IMARPE),
Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito, Callao - Perú.

^aralej@imarpe.gob.pe

Fecha recepción: enero 4 de 2023

Fecha aceptación: noviembre 25 de 2023

Resumen

En este estudio se desarrolló un modelo predictivo para cuantificar la densidad celular de microalgas a través de la relación que existe con la absorbancia. Para ello, se determinó la longitud de onda específica de absorbancia máxima para dos especies de microalgas con importancia en la acuicultura: *Isochrysis galbana* (680 nm) y *Chaetoceros calcitrans* (676 nm). Posteriormente, el modelo predictivo fue generado mediante la construcción de una curva de calibración, se emplearon 5 niveles de concentración para cada especie y se realizó por quintuplicado. El rango de concentración para *C. calcitrans* fue de $0,8 - 4,3 \times 10^6$ células/mL (0,8; 1,7; 2,5; 3,4 y $4,3 \times 10^6$ células/mL) y para *I. galbana* fue de $1,6 - 7,8 \times 10^6$ células/mL (1,6; 3,2; 4,7; 6,3 y $7,8 \times 10^6$ células/mL). Como resultado se obtuvieron las siguientes ecuaciones: $y = 0,0004 + 0,0581 * (Abs_{I. galbana})$, y $y = 0,0065 + 0,1001 * (Abs_{C. calcitrans})$, donde "y" es la variable de respuesta, es decir, la densidad celular de las microalgas. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos fueron altos 0,991 y 0,981 para *I. galbana* y *C. calcitrans*, respectivamente; lo que indica una fuerte correlación entre la absorbancia y la densidad celular. Por lo tanto, la ecuación del modelo lineal permite determinar la densidad celular de las microalgas en función de los valores de absorbancia medidos mediante las ecuaciones mencionadas.

Palabras clave: Absorbancia; Densidad óptica; Espectrofotometría; Microalgas.

Use of the spectrophotometric method for cell quantification of marine microalgae for use in aquaculture

Abstract

In this study, a predictive model was developed for the quantification of cell density of microalgae based on absorbance. For this purpose, the specific wavelength of maximum absorbance was determined for two microalgae species of importance in aquaculture: *Isochrysis galbana* (680 nm) and *Chaetoceros calcitrans* (676 nm). Subsequently, the predictive model was generated through the construction of a calibration curve, five concentration levels were used for each species and the experiment was performed in quintuplicate. The concentration range for *C. calcitrans* was $0,8-4,3 \times 10^6$ cells/mL (0.8; 1.7; 2.5; 3.4 and 4.3×10^6 cells/mL) and for *I. galbana* it was $1.6 - 7.8 \times 10^6$ cells/mL (1.6; 3.2; 4.7; 6.3 and 7.8×10^6 cell/mL). As a result, the following equations were obtained: $y = 0.0004 + 0.0581*(Abs_{I. galbana})$ and $y = 0.0065 + 0.1001*(Abs_{C. calcitrans})$, where "y" represents the response variable, i.e., the cell density of the microalgae. The coefficients of determination (R^2) obtained were high 0.991 and 0.981 for *I. galbana* and *C. calcitrans*, respectively; indicating a strong correlation between absorbance and cell density. Therefore, the linear model equation allows determination of cell density as a function of absorbance values measured using the aforementioned equations.

Keywords: Absorbance; Optical density; Spectrophotometry; Microalgae.

Uso do método espectrofotométrico para quantificação celular de microalgas marinhas para uso em aquicultura

Resumo

Neste estudo, foi desenvolvido um modelo preditivo para quantificar a densidade celular de microalgas através da relação que existe com a absorbância. Para isso, foi determinado o comprimento de onda específico de absorbância máxima para duas espécies de microalgas de importância na aquicultura: *Isochrysis galbana* (680 nm) e *Chaetoceros calcitrans* (676 nm). Em seguida, o modelo preditivo foi gerado através da construção de uma curva de calibração, utilizando 5 níveis de concentração para cada espécie e realizando o experimento em quintuplicado. A faixa de concentração para *C. calcitrans* foi de $0,8 - 4,3 \times 10^6$ células/mL (0,8; 1,7; 2,5; 3,4 e $4,3 \times 10^6$ células/mL) e para *I. galbana* foi de $1,6 - 7,8 \times 10^6$ células/mL (1,6; 3,2; 4,7; 6,3 e $7,8 \times 10^6$ células/mL). Como resultado, foram obtidas as seguintes equações: $y = 0,0004 + 0,0581*(Abs_{I. galbana})$ e $y = 0,0065 + 0,1001*(Abs_{C. calcitrans})$; onde "y" é a variável de resposta, ou seja, a densidade celular das microalgas. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram altos 0,991 e 0,981 para *I. galbana* e *C. calcitrans*, respectivamente. Isso indica uma forte correlação entre a absorbância e a densidade celular. Portanto, a equação do modelo linear permite determinar a densidade celular das microalgas com base nos valores de absorbância medidos utilizando as equações mencionadas.

Palavras-chave: Absorção; Densidade ótica; Espectrofotometria; Microalgas.

Introducción

En el ámbito de la acuicultura, se reconoce la importancia de los cultivos auxiliares, como microalgas, artemias, rotíferos y cladóceros. Estos organismos desempeñan un papel fundamental como alimento vivo durante los primeros días de vida de larvas de peces, moluscos, crustáceos e incluso algunos gasterópodos, hasta sus etapas juveniles [1-4]. Las microalgas, en particular, tienen un papel destacado, ya que no solo son el principal alimento de los organismos filtradores, sino que también se pueden utilizar en la técnica conocida como “agua verde”, donde se cultivan simultáneamente con las larvas de peces en tanques [5,6].

A medida que la producción acuícola aumenta, la demanda de microalgas también se incrementa, lo que implica la necesidad de lograr altas densidades en los cultivos. Por lo tanto, es crucial conocer y monitorear el crecimiento poblacional de las microalgas para tomar decisiones clave relacionadas con las condiciones del proceso de cultivo, como el control de temperatura, intensidad de luz y adición de nutrientes [5,7], así como determinar el momento óptimo para la cosecha de las microalgas [8].

En cuanto al crecimiento poblacional de las microalgas, este se divide en varias fases, que incluyen la adaptación o período lag, fase exponencial, desaceleración, fase estacionaria y muerte celular [9]. Cada fase de crecimiento de las microalgas puede ser especificada según su tasa de crecimiento, es decir, la velocidad de cambio en la densidad celular por unidad de tiempo. La tasa de crecimiento es un parámetro clave que se considera en la comparación de diferentes métodos de cultivo [8].

Existen varios métodos para determinar la densidad celular de las microalgas, siendo los más utilizados las mediciones directas tradicionales. Estos métodos implican el conteo directo de células utilizando una cámara Neubauer y un microscopio óptico, o la determinación del peso seco de las células [10,11]. Sin embargo, estos métodos requieren habilidades de laboratorio especializadas, el uso de reactivos exógenos, una gran cantidad de muestras, procesos de centrifugación, secado de muestras, entre otros procedimientos [12]. Además, son métodos que demandan mucho tiempo y no proporcionan mediciones en tiempo real, lo que a menudo se considera tedioso y lento [13-15].

Como alternativa a los métodos tradicionales, se ha desarrollado la espectrofotometría, también conocida como método de densidad óptica o absorbancia, que se utiliza ampliamente para la cuantificación celular y la determinación de biomasa. Este método requiere la construcción de curvas de calibración específicas para cada especie que se desea medir, estableciendo una correlación entre el recuento de células y la absorbancia [9]. Sin embargo, además del tamaño de las células, existen otros factores que pueden influir en la confiabilidad de las mediciones [16]. Por ejemplo, la presencia de restos celulares en el medio de cultivo o la superposición de células, causada por una alta densidad celular, pueden afectar la exactitud de las mediciones de absorbancia. Por lo tanto, al utilizar la espectrofotometría, es fundamental considerar y controlar estos factores adicionales para obtener mediciones precisas y confiables de la densidad celular y la biomasa.

Bajo este contexto, el presente estudio tiene como objetivo desarrollar un modelo predictivo ajustado a la fase exponencial, que permita estimar la densidad celular a partir de la absorbancia del crecimiento de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*. Esta fase del crecimiento es de particular importancia en la producción de alimento vivo para otros organismos, ya que durante este periodo las microalgas alcanzan su máximo contenido de biocompuestos beneficiosos para el óptimo desarrollo de las larvas de peces y zooplancton. Al desarrollar esta herramienta en el Laboratorio de Alimento Vivo, se brinda la oportunidad de estimar en tiempo real la concentración celular de las microalgas, lo que facilita la planificación de la cosecha en el momento óptimo y asegura la disponibilidad de un alimento vivo de calidad para los organismos dependientes de estas microalgas.

Metodología

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Alimento Vivo del Centro de Investigación en Acuicultura (CIA) Alexander Von Humboldt del Instituto del Mar del Perú.

Material celular

Se emplearon las siguientes cepas de microalgas: *Isochrysis galbana* (IMP-BG-010) y *Chaetoceros calcitrans* (Ch.cal), las cuales fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del IMARPE, a un volumen

de 250 mL. Posteriormente, el escalonamiento fue realizado a 500 mL y 1 L en el Laboratorio de Alimento Vivo. El modo de cultivo fue discontinuo y el medio de cultivo empleado fue Guillard F/2 [17]. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ambiental (19 ± 1 °C), iluminación constante a través de paneles LED (1000 lux/m^2), salinidad de 35 ppt y aireación constante a un flujo de 0,5 L/min. El cultivo de cada especie fue realizado por separado y las condiciones de cultivo fueron las mismas para ambas especies. Se realizó el monitoreo de los cultivos hasta determinar la máxima densidad y a partir de este inóculo se realizaron diluciones para la construcción de la curva de calibración.

Determinación de la máxima absorbancia

La absorbancia máxima fue determinada para cada especie de microalga analizada. Para ello, se realizó un escaneo de muestras de los cultivos en un rango entre 400 y 900 nm, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Orion AquaMate 8100. Se utilizó el valor máximo de absorbancia de cada microalga para determinar la relación entre la absorbancia y la concentración celular [14,9].

Conteo celular

Las densidades celulares fueron determinadas mediante conteo directo utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico marca LEICA. Para el conteo, se siguió la metodología descrita por Arredondo y Voltolina [9]. Las concentraciones se calcularon utilizando la Ecuación (1) y los resultados se expresaron en células por mililitro (células/mL) [18,9]. Los conteos de cada muestra fueron realizados por quintuplicado y se utilizaron micropipetas durante todas las mediciones volumétricas para garantizar la precisión de los resultados.

$$C = N * 10^4 * dil \quad (1)$$

donde, C : concentración celular (células/mL); N : promedio de células presentes en 1 mm^2 ($0,1 \mu\text{L}$); dil : factor de dilución.

Construcción de la curva de calibración

Para generar la curva de calibración, se tomó un inóculo de los cultivos en la fase exponencial, cuya concentración celular fue calculada mediante conteo directo. A partir del valor obtenido se

realizaron cinco diluciones o niveles de referencias; cada dilución se replicó cinco veces. Seguidamente, se efectuaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro. Inmediatamente después de la medición, se transfirió la suspensión celular a un vial y se fijó con una gota de Lugol para luego proceder al conteo de células.

Con los datos obtenidos, se graficó la absorbancia en función de la concentración celular para verificar la linealidad de los datos. También se determinó el rango de trabajo y la densidad máxima que puede alcanzar dentro del área de trabajo. Con esta información, se construyó una curva de calibración para cada especie.

La construcción de la curva de calibración permite establecer una relación cuantitativa entre la absorbancia y la concentración celular. Esto facilita la estimación precisa de la densidad celular a partir de mediciones de absorbancia en futuros experimentos. Es importante destacar que, si bien los modelos generados no se utilizaron directamente para predecir el comportamiento en una cinética de crecimiento, representan una estrategia potencial para validar el modelo predictivo en investigaciones futuras.

En el caso de *C. calcitrans*, se abarcó un rango de concentración de $0,8$ a $4,3 \times 10^6$ células/mL, empleando cinco niveles de referencia ($0,8$; $1,7$; $2,5$; $3,4$ y $4,3 \times 10^6$ células/mL). Para *I. galbana*, se trabajó en un rango de concentración de $1,6$ a $7,8 \times 10^6$ células/mL, utilizando también cinco niveles de referencia ($1,6$; $3,2$; $4,7$; $6,3$ y $7,8 \times 10^6$ células/mL). No se empleó una solución patrón de microalgas debido a que las células vivas pueden presentar variaciones en la intensidad de sus pigmentos según el tiempo y las condiciones de cultivo. Por lo tanto, los resultados obtenidos son específicos para nuestro laboratorio y nuestras condiciones de cultivo, y se brindan como referencia para futuras mediciones de estas especies.

Modelo Predictivo

Para el desarrollo del modelo predictivo se realizó un análisis de regresión lineal, previamente se verificó que los datos sigan una distribución normal y tengan una correlación muy alta. Asimismo, se verificó que los datos cumplan con los cuatro supuestos de un análisis de regresión (linealidad, independencia de residuos, homocedasticidad de residuos y normalidad de los residuos). El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS Statistics 26 y se obtuvieron los coeficientes

de regresión, el coeficiente de determinación ajustado (R^2 adj) y el coeficiente de correlación (r). Los modelos predictivos fueron desarrollados empleando la Ecuación (2):

$$y = \beta_0 + \beta_1 * x \quad (2)$$

donde, y : es la densidad celular estimada en células/mL, x : es el valor de la absorbancia medido, β_0 : es el intercepto y β_1 : es la pendiente de la recta. Ambos son los coeficientes de regresión estimados a partir del análisis de regresión lineal y representan la relación entre la variable dependiente (densidad celular estimada en

células/mL) y la variable independiente (valor de la absorbancia medido).

Resultados

Absorbancia máxima

La longitud de onda fue escaneada desde 400 hasta 900 nm; se encontró que la absorbancia máxima para *C. calcitrans* se observó a una longitud de onda de 676 nm (Figura 1), mientras que para *I. galbana* se obtuvo a una longitud de onda de 680 nm (Figura 2), lo que sugiere que ambas especies presentaron perfiles de absorbancia similares, lo cual puede indicar similitudes en la composición y contenido de pigmentos fotosintéticos entre ellas.

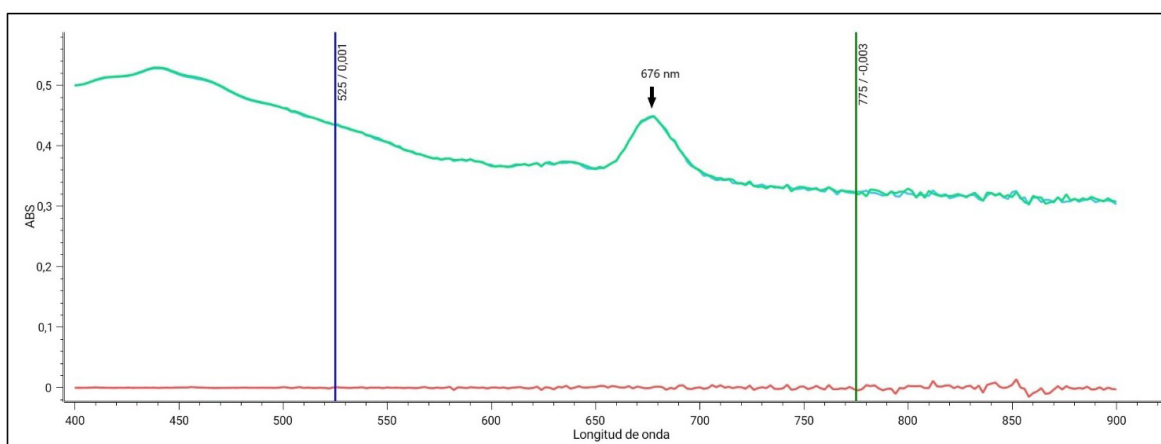


Figura 1. Patrón de absorción de luz para una muestra de cultivo de *Chaetoceros calcitrans* escaneada entre 400 y 900 nm. La flecha oscura indica el pico de absorción para esta especie. nm = nanómetros.

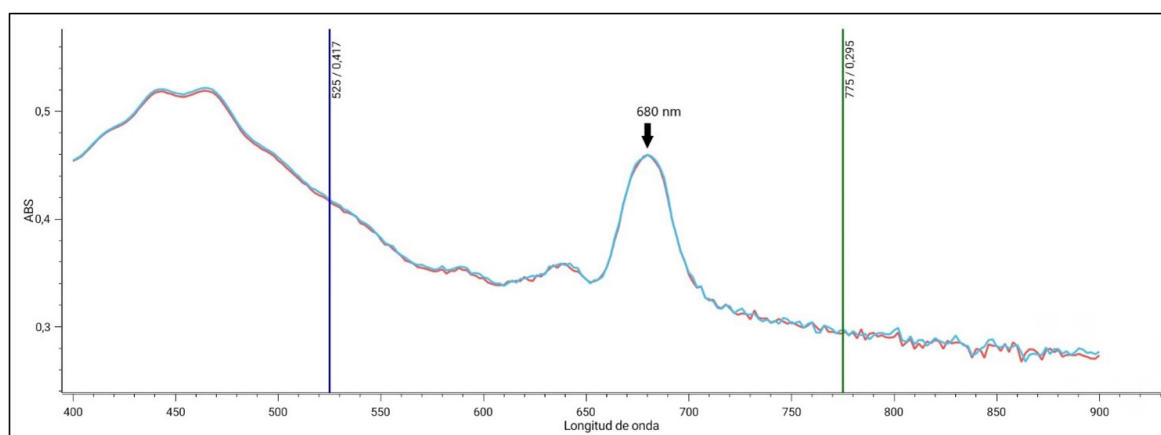


Figura 2. Patrón de absorción de luz para una muestra de cultivo de *Isochrysis galbana* escaneada entre 400 y 900 nm. La flecha oscura indica el pico de absorción para esta especie. nm = nanómetros.

Curva de calibración

En las Figuras 3 y 4, se aprecia que existe una relación directa entre la absorbancia de luz y la densidad celular para las dos especies de microalgas, ya que cuanto mayor es la densidad de células presentes en la muestra, mayor es la cantidad de luz absorbida, lo que se refleja en valores más altos de absorbancia. Por ejemplo, en el caso de *C. calcitrans*, se observó que las lecturas de absorbancia más altas, como 0,445 y 0,443, corresponden a concentraciones celulares de 4,27 y 4,13 x10⁶ células/mL, respectivamente. Por otro lado, las lecturas de absorbancia más bajas, como 0,079 y 0,087, están asociadas con concentraciones celulares de 0,82 y 0,83 x10⁶ células/mL, respectivamente. En el caso de *I. galbana*, las lecturas de absorbancia más altas fueron de 0,459 y 0,458, que correspondieron a concentraciones celulares de 7,94 y 7,99 x 10⁶ células/mL, respectivamente. Mientras que, las lecturas de absorbancia más bajas, como 0,088 y 0,090 estuvieron asociadas con densidades de 1,61 y 1,65 x 10⁶ células/mL, respectivamente. Estos resultados evidencian la relación proporcional entre la absorbancia y la densidad celular en un amplio rango de concentraciones, lo cual respalda la utilidad de la espectrofotometría como una herramienta confiable para estimar la concentración celular en cultivos de *C. calcitrans* e *I. galbana*. La construcción de curvas de calibración basadas en estos datos permitiría una estimación precisa de la concentración celular en futuros experimentos dentro de este rango de trabajo.

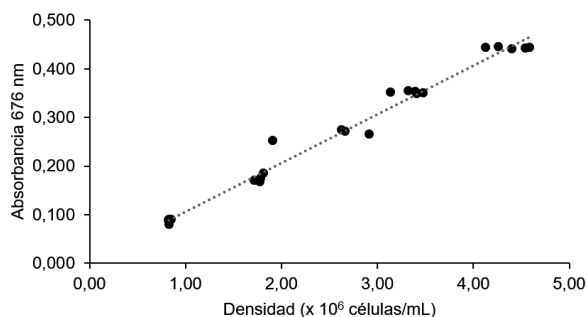


Figura 3. Relación entre la absorbancia y la densidad celular de *Chaetoceros calcitrans*. nm = nanómetros.

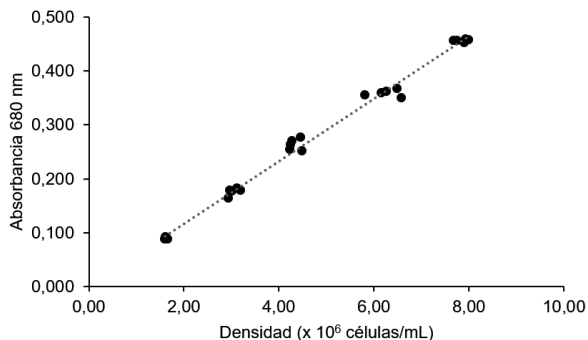


Figura 4. Relación entre la absorbancia y la densidad celular de *Isochrysis galbana*. nm = nanómetros.

Modelos predictivos

Los modelos predictivos fueron determinados para *I. galbana* y *C. calcitrans*. En la Tabla 1, se resume los coeficientes de regresión de los modelos predictivos obtenidos. Asimismo, el coeficiente de determinación para ambas especies fue mayor a 0,98 y el coeficiente de correlación fue de 0,99 en ambas especies, lo que indica que existe una muy alta correlación entre la absorbancia de las suspensiones de microalgas y la concentración celular.

Tabla 1. Coeficientes de regresión para los modelos predictivos de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*. β_0 : intercepto, β_1 : pendiente de la recta.

Especie	β_0	β_1	R ² adj	r
<i>Isochrysis galbana</i>	0,001	0,058	0,991	0,996
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,006	0,100	0,9810	0,990

Finalmente, con el análisis de ANOVA se obtuvo un p-valor <0,05 para ambas especies, lo que indica que el modelo es el adecuado para realizar la estimación. Por lo tanto, el modelo para las microalgas es el siguiente: $y = 0,0004 + 0,0581 * (Abs_{I. galbana})$; $y = 0,0065 + 0,1001 * (Abs_{C. calcitrans})$.

Discusión

La elección de la longitud de onda para las lecturas de absorbancia en nuestras especies de microalgas varió debido a la presencia de

pigmentos fotosintéticos distintivos, como la clorofila (Chl) a, b, c y d, así como carotenoides y otros pigmentos accesorios. Mientras algunas recomendaciones respaldan el uso de 675 nm por su proximidad al pico de absorción de la Chl a [19], se reconoce la variabilidad en las sugerencias de otros autores, quienes proponen 550 nm para abordar las variaciones en el contenido de clorofila bajo diversas condiciones lumínicas y de cultivo [9]. Es crucial destacar que las clorofilas b, c y d están restringidas a ciertas especies de microalgas, como Chl b presente en Prasinophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae, Chl c en Cryptophyceae, y Chl d en Rhodophyceae [19]. Este reconocimiento de la diversidad pigmentaria subraya la importancia de una selección de longitud de onda precisa para obtener mediciones confiables de absorbancia en estudios de microalgas.

En el presente estudio, la absorbancia máxima de *C. calcitrans* fue a 676 nm, este valor fue cercano a otros estudios, en los que se reporta que el crecimiento celular para *C. calcitrans* fue a 688 nm [20] y 690 nm [21]; mientras que, para *C. muelleri* fue a 560 nm [22] y para *C. gracilis* a 680 nm [21]. Para el caso de *I. galbana*, la absorbancia máxima fue a 680 nm, este valor coincide con lo reportado por otro investigador [23], aunque la correlación obtenida en su estudio fue baja ($r=0,42$). Otros estudios reportan valores similares a 682 nm [20], 686 nm [21], 664 y 650 nm [24].

Los estudios revisados muestran que ambas especies son capaces de absorber la luz roja (620 a 750 nm), aunque las diatomeas e *Isochrysis* sp. también son capaces de absorber la luz azul fotosintéticamente utilizable (445 nm) debido a la presencia de diferentes contenidos de pigmentos (Chl a y d) [25]. En general, para las mediciones de densidad óptica se sugiere emplear el rango entre 664 a 690 nm, debido a que estos valores están correlacionados con la absorbancia de la clorofila [26].

Considerando las variables que pueden afectar en las mediciones espectrofotométricas, abordamos los factores críticos para asegurar la precisión de nuestros resultados. Uno de estos factores fue la elección de un medio de cultivo incoloro con el fin de minimizar posibles interferencias cromáticas [20]. Aunque esta elección proporcionó una base sólida para nuestras mediciones, reconocemos la importancia de considerar otros escenarios como en los cultivos masivos donde se emplean fertilizantes foliares u otros medios con coloración.

En tales casos, se sugiere la construcción de una nueva curva de calibración adaptada a estas condiciones específicas. Otros factores que pueden afectar son la variabilidad en la morfología de las células y el tiempo de sedimentación de la muestra, especialmente en las diatomeas, dada su propensión a sedimentar debido a la falta de motilidad en comparación con las microalgas flageladas. Esta interferencia se evitó mediante una cuidadosa homogeneización previa a las lecturas y tomas de muestras, con el fin de evitar introducir variaciones en las mediciones de absorbancia. Asimismo, en nuestro laboratorio, el mantenimiento protocolizado de las condiciones de cultivo no solo fortaleció la coherencia de nuestras mediciones, sino que también desempeñó un papel crucial en la reducción del material en suspensión, contribuyendo a la fiabilidad general de nuestros resultados y permitiéndonos establecer relaciones más claras entre la absorbancia y la densidad celular en condiciones predecibles.

Por lo que se refiere al coeficiente de determinación de la ecuación de la recta, los valores obtenidos en nuestros modelos ($R^2_{chc} = 0,981$; $R^2_{iso} = 0,991$) evidencian que los valores de la absorbancia y la densidad celular están muy relacionados entre sí, por lo tanto, la ecuación del modelo lineal permite determinar la densidad en base a la absorbancia. Estos resultados son consistentes con otros estudios, como el de Alam et al., quienes obtuvieron coeficientes de determinación de 0,998 para *C. calcitrans* y 0,995 para *I. affinis galbana* (T-Iso) [20]. Por otro lado, Nevarez et al. reportaron una correlación alta para *I. galbana* (0,94), aunque para *C. calcitrans* el valor obtenido (0,85) fue más bajo, indicando que la ecuación de la recta no sería adecuada para cuantificar la densidad celular en este caso [21].

Es importante destacar que, en muchos estudios de modelado de cinéticas de crecimiento se realiza la medición directa del crecimiento celular a lo largo del tiempo, sin necesidad de recurrir a diluciones preparadas. Estos enfoques directos permiten obtener una visión más completa y precisa del comportamiento de las células durante su ciclo de crecimiento. Sin embargo, en este estudio optamos por utilizar diluciones y técnicas de espectrofotometría para establecer una relación cuantitativa entre la absorbancia y la concentración celular, con el objetivo de desarrollar un modelo predictivo de densidad celular. Esta elección nos permitió obtener resultados satisfactorios y construir curvas de calibración para las especies

estudiadas. No obstante, reconocemos que la validación y comparación de nuestro modelo en una cinética de crecimiento real sería un enfoque interesante para futuras investigaciones, que nos permitiría evaluar aún más su desempeño en condiciones dinámicas y garantizar su aplicabilidad en situaciones más complejas y cercanas a la realidad.

Finalmente, es importante considerar que el método espectrofotométrico es una medida indirecta y puede verse afectado por varios factores, siendo la concentración celular y el grado de pigmentación, las que dependen principalmente de las condiciones de cultivo, por lo que una variación puede generar cambio en el contenido del pigmento y, por ende, causar un error significativo en el cálculo de la densidad [27], por tal motivo se sugiere que las condiciones de cultivo para cada especie se encuentren protocolizadas con el fin de evitar errores en los modelos predictivos desarrollados. Además, la cuantificación se realiza en muestras vivas, sin adición de preservantes que suelen interferir en la coloración de los cultivos, lo que favorece en las lecturas en tiempo real.

Conclusiones

Este estudio ha demostrado una fuerte correlación entre la absorbancia y la densidad celular en los cultivos de las microalgas *C. calcitrans* e *I. galbana*. Los coeficientes de determinación obtenidos en nuestros modelos ($R^2_{chc}=0,981$; $R^2_{iso}=0,991$) indicaron una relación estrecha entre ambas variables, lo que permite determinar la densidad celular en base a las lecturas espectrofotométricas. Sin embargo, es importante considerar que el método espectrofotométrico es una medida indirecta que puede verse afectada por varios factores por lo que es importante tenerlos en cuenta para minimizar los errores en las mediciones.

Para futuras investigaciones, se recomienda validar y comparar el modelo desarrollado en una cinética de crecimiento de cultivos masivos, considerando factores adicionales como tipos de medio utilizado. Esto permitirá evaluar aún más el desempeño del modelo en condiciones dinámicas y mejorar su aplicabilidad en el monitoreo de cultivos microalgales.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada financieramente por el proyecto PpR 094-2022 “Estudio de la calidad del alimento vivo” financiado por el Instituto del Mar del Perú. Agradecemos al equipo profesional del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos por proporcionar las cepas de microalgas para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradecemos al Mg. Jhon Dionicio Acedo por el apoyo en la traducción del resumen al portugués y los aportes al manuscrito. También al Mg. Leenin Flores Ramos por su orientación en la construcción de la curva de calibración.

Referencias

- [1] Prieto M, De la Cruz L, Morales M. Cultivo experimental del Cladóceros *Moina sp.* alimentado con *Ankistrodesmus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. MVZ Córdoba. 2006;11(1):705-714. doi.org/10.21897/rmvz.455
- [2] Ferreira M, Maseda A, Fábregas J, Otero A. Enriching rotifers with “Premium” microalgae. *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO. Aquaculture. 2008;279:126-130. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.044
- [3] Welladsen H, Kent M, Mangott A, Li Y. Shelf-life assessment of microalgae concentrates: Effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. Aquaculture. 2014;430:241-247. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.016
- [4] Samat NA, Yusoff FM, Rasdi NW, Karim M. Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. Animals. 2020;10(12):2457. doi.org/10.3390/ani10122457
- [5] Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan JK. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture. 1997;151(1-4):315–331. doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3
- [6] McLean E. Fish tank color: An overview. Aquaculture. 2021;530:735750. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735750
- [7] Lehmuskero A, Skogen Chauton M, Boström T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical

- processes. *Prog. Oceanogr.* 2018;168:43-56. doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002
- [8] Wungmool P, Rangsi N, Hormwantha T, Sutthiopad M, Luengviriya C. Measurement of the cell density of microalgae by an optical method. *J Phys Conf Ser.* 2019;1298(1):012005. doi.org/10.1088/1742-6596/1298/1/012005
- [9] Arredondo-Vega BO, Voltolina D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.* Arredondo-Vega BO, Voltolina D, Editores. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2007. p. 21.
- [10] Li S, Xu J, Chen J, Chen J, Zhou C, Yan X. The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. *Aquaculture.* 2014;428–429:104–110. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.032
- [11] Wang H, Zhu R, Zhang J, Ni L, Shen H, Xie P. A Novel and Convenient Method for Early Warning of Algal Cell Density by Chlorophyll Fluorescence Parameters and Its Application in a Highland Lake. *Front. Plant Sci.* 2018;9:869. doi.org/10.3389/fpls.2018.00869
- [12] Lee TH, Chang JS, Wang HY. Current Developments in High-Throughput Analysis for Microalgae Cellular Contents. *Biotechnol. J.* 2013;8:1301–1314. doi.org/10.1002/biot.201200391
- [13] Nielsen L, Smyth G, Greenfield P. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *J. Biotech. Prog.* 1991;7(6):560–563. doi.org/10.1021/bp00012a600
- [14] Ribeiro-Rodrigues LH, Arenzon A, Raya-Rodriguez MT, Fontoura NF. Algal density assessed by spectrophotometry: a calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 2011;3(8):225–228. doi.org/10.5897/JECE2011.025
- [15] Louis KS, Siegel AC, Levy GA. Comparison of manual versus automated trypan blue dye exclusion method for cell counting. En: *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols.* Series Methods in Molecular Biology. Stoddart MJ, Editor. Estados Unidos: Springer Protocols; 2011. p. 7–12.
- [16] Alam MA, Muhammad G, Rehman A, Russel M, Shah M, Wang Z. Standard Techniques and Methods for Isolating, Selecting and Monitoring the Growth of Microalgal Strain. En: *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment.* Alam M, Wang Z, Editores. Singapur: Springer; 2019, p. 85-86. doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_4
- [17] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of Marine Invertebrate Animals.* Smith WL, Chanley MH, Editores. Plenum Press, N.Y.; 1975. p. 48.
- [18] Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA. Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. En: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology.* Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. Editores. Estados Unidos: Springer; 2012. p. 41–48. doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_4
- [19] Abalde J, Cid A, Fidalgo Paredes P, Torres E, Herrero C. *Microalgas: cultivo y aplicaciones.* España: Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións; 1995. doi.org/10.17979/spudc.9788497497695
- [20] Santos-Ballardo D, Rossi S, Hernández V, Vázquez Gómez R, Rendón-Unceta M, Caro-Corrales J, et al. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture.* 2015;448:87-92. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044
- [21] Alfaro D, Gómez A, Rovira M. Evaluación de la correlación existente entre densidad celular y densidad óptica de microalgas marinas. *Artículos Científicos del V Congreso de Ingeniería y Arquitectura;* 2015; Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas” – UCA, La Libertad, El Salvador. La Libertad: Talleres Gráficos UCA ISSN X; 2016. p. 95-102.
- [22] Nevarez L, Carrillo E, López E, Vargas J, Noriega J. Cinética de crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri* en un fotobiorreactor. *Biotecnia.* 2017;19:14-18. doi.org/10.18633/biotecnia.v19i0.360
- [23] Awah Che C, Hee Kim S, Jun Hong H, Katongole Kityo M, Yung Sunwoo I, Jeong GT, et al. Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture

- to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system. *Bioresour. Technol.* 2019;285:121323. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121323
- [24] Pavia-Gómez M, García-Romeral J, Chirivella-Martorell J, Serrano-Aroca A. Direct spectrophotometric method to determine cell density of *Isochrysis galbana* in serial batch cultures from a larger scale fed-batch culture in exponential phase. *Nereis.* 2016;8:35-43.
- [25] Ritchie R, Sma-Air S, Runcie J. Light absorbance of algal films for photosynthetic rate determinations. *J. Appl. Phycol.* 2022;34:2463–2475. doi.org/10.1007/s10811-022-02782-3
- [26] Bricaud A, Morel A, Babin M, Allali K, Claustre H. Variations of Light Absorption by Suspended Particles with Chlorophyll a Concentration in Oceanic (Case 1) Eaters: analysis and Implications for Bio-Optical Models. *J. Geophys. Res.* 1998;103(C13):31033–31044. doi.org/10.1029/98JC02712
- [27] Griffiths MJ, Garcin C, Hille RPV, Harrison STL. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J Microbiol Methods.* 2011;85(2):119–23. doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005