



Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza

Biomass production of *Tetraselmis suecica* using seawater with sanguaza

Juan Silva B.¹, Víctor Vásquez V.^{2*}, Fernando Merino M.³

¹ Escuela de Ingeniería Agroindustrial (Universidad Nacional de Trujillo) Avda. Juan Pablo II s/n Trujillo, Perú

² Departamento de Ciencias Agroindustriales (Universidad Nacional de Trujillo) Avda. Juan Pablo II s/n Trujillo, Perú

³ Departamento de Biología, Microbiología y Biotecnología (Universidad Nacional del Santa) Avda. Pacífico 508 – Nuevo Chimbote, Ancash, Perú

Recibido 25 febrero 2011; aceptado 28 marzo 2011

Resumen

Se evaluó el crecimiento de *Tetraselmis suecica*. El experimento fue realizado aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con un Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con dos factores; pH y concentración sanguaza/agua de mar, en los rangos de 7 - 9 y 2 - 5 % (v/v) respectivamente. Los medios de cultivo fueron agitados por burbujeo de aire constante (0.07 L/s) e iluminados de manera continua con luz fluorescente de 40 W en recipientes de vidrio de 1.5 L de capacidad a una temperatura de 22.5 ± 2.1 °C. Se determinó, utilizando el modelo matemático de Gompertz, que a partir de un pH de 8.0 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 3.5% se logra el crecimiento máximo de *Tetraselmis suecica*. Un pH de 8.71 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 4.56% permiten obtener un crecimiento máximo ($\log N/N_0$) de *Tetraselmis suecica* de 0.659, con un error de 12.3% al aplicar un modelo matemático de 2º orden. Los valores obtenidos con el medio de cultivo sanguaza/agua de mar, superaron al medio de cultivo tradicionalmente usado (Guillard F/2 con agua de mar). Los resultados demuestran la potencialidad de uso del medio sanguaza/agua de mar en estudios escalables a nivel piloto de producción de *Tetraselmis suecica*, con miras a la producción de biodiesel.

Palabras clave: Cinética de crecimiento, *Tetraselmis suecica*, sanguaza, Superficie de Respuesta, modelo de Gompertz.

Abstract

The growth of *Tetraselmis suecica* was evaluated. The experiment was realized using the Response Surface Methodology (RSM) with Central Composite Rotational Design (CCRD) with two factors, pH and sanguaza/seawater concentration in the range of 7 - 9 and 2 - 5 % (v/v), respectively. The culture media were stirred by bubbling air constantly (0.07 L/s) and continuously illuminated with 40 W of fluorescent light in glass containers of 1.5 L capacity at a temperature of 22.5 ± 2.1 °C. Using the Gompertz mathematical model was determined that from an 8.0 of pH and a ratio of 3.5% of sanguaza/seawater, the *Tetraselmis suecica* achieves maximum growth. An 8.71 of pH and a ratio of 4.56% of sanguaza/seawater allow the *Tetraselmis suecica* maximum growth ($\log N/N_0$) of 0.659, with a 12.3% of prediction error by applying a mathematical model of 2nd order. According to the study, the values obtained in sanguaza/seawater as a culture medium outperformed the traditionally used culture medium (Guillard F/2 with seawater). The results demonstrate the potential use of the sanguaza/seawater medium in scalable studies on pilot scale production of *Tetraselmis suecica*, with a view to the production of biodiesel.

Keywords: Growth kinetics, *Tetraselmis suecica*, sanguaza, response surface, Gompertz model.

* Autor para correspondencia

E-mail: vjvv@hotmail.com (V. Vásquez)

1. Introducción

Las algas (macro y microalgas) han sido utilizadas por centurias por diferentes civilizaciones en la alimentación humana y animal. Las microalgas o algas microscópicas, vienen siendo cultivadas de manera industrial para la producción de proteínas, vitaminas y otros suplementos nutritivos; son empleadas en simbiosis con las bacterias para la remoción de fosfatos y nitratos de aguas residuales, como biofertilizantes (Mora *et al.*, 2005). Su cultivo se ha visto incrementado por ser fuente de ácidos grasos insaturados, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (Bermejo *et al.*, 2002).

Las algas microscópicas han merecido considerable atención por su potencialidad como fuente de biodiesel, por la posibilidad de suplir de manera parcial la escasez de suministro de petróleo y asimismo, se presentan como una alternativa a los precios elevados de las materias primas tradicionales, para la obtención de los biocombustibles como son la soja, caña de azúcar, maíz, palma aceitera, colza, grasas animales, residuos de grasas, entre los más representativos.

Se reporta que reunir solo la mitad de biodiesel que necesita el transporte existente en EE.UU, requiere de grandes áreas de cultivo para producir mayor cantidad de oleaginosas. En el caso de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y jatropha (*Jatropha podagrica*), plantas de buen rendimiento, necesitarían que el 24% y 45% del total de tierra respectivamente, esté dedicado a su cultivo para cubrir solamente 50% de la necesidad de combustible de transporte.

Es evidente que en un futuro inmediato la contribución de los cultivos de oleaginosas no alcanzará para reemplazar los combustibles líquidos, por lo que algunas compañías están intentando comercializar biodiesel a partir de la biomasa algal obtenida en cultivos (Knothe *et al.*, 1997; Lee, 1997).

Si se lograría implementar el uso microalgas para producir biodiesel, entre 1 y 3% del total de área de cultivo de los EE.UU., serían suficientes para producir la biomasa que satisfaga el 50% del combustible que necesita el transporte (Sheehan *et al.*, 1998) y su cultivo no comprometería la producción de alimento, forraje y otros productos.

Dependiendo de las especies, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos (Álvarez y Zarco, 1989; Guschina y Harwood, 2006), de los cuales no todos son adecuados para producir biodiesel.

La cantidad total de lípidos, así como la tipología de los ácidos grasos presentes, además de ser específica para cada especie, está ligada a factores ambientales como la intensidad luminosa, pH, salinidad, temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio de cultivo (Alvarez, 1989).

Entre las microalgas de potencial importancia para la producción de biocombustibles que existen en los cuerpos de agua marina, se encuentra la *Tetraselmis suecica*, la cual posee en base seca 52% de proteína y entre 15 a 23% de lípidos (Hirata *et al.*, 2001). Se caracteriza por ser una alga *Chlorofita*, unicelular y móvil, de 7 a 9 µm de diámetro y 10 a 16 µm de largo (Diaz *et al.*, 2006). En cultivos autotróficos puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas como urea, fosfato diamónico, nitratos, nitritos, etc; y en cultivo heterotrófico como ensilado de pescado puede metabolizar diversos aminoácidos y vitaminas, sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Bold y Wynne, 1985).

Actualmente se realizan esfuerzos para la generación de nuevas metodologías y desarrollo tecnológico para la producción masiva de microalgas y sus derivados, mediante el uso de medios de cultivos alternativos. Una alternativa a los medios de cultivo tradicionales ya estandarizados (puros y químicamente definidos, como el medio Guillard) son los sustratos orgánicos,

mayormente subproductos de otras industrias y en cuya composición se encuentran fuentes de C, N, P, microelementos y oligoelementos. Utilizándose en la actualidad diversas harinas (de pescado, soya, lombriz de tierra, girasol), gallinaza, gas, aceites, melaza de caña, exudados gomosos y residuos pesqueros como la sanguaza (Herrero *et al.*, 1994).

En Perú, los residuos pesqueros se producen en grandes cantidades como consecuencia de la intensa actividad de la industria pesquera, que es una de las actividades extractivas importantes del país. Los residuos como vísceras, cabezas, piel, huesos y colas, se cuantifican alrededor del 50% de la materia prima, resultando finalmente en contaminantes al ser vertidos indiscriminadamente al medio ambiente, provocando problemas de contaminación y enfermedades.

Un residuo de importancia es la “sanguaza”, efluente constituido por agua, sangre y sólidos de pescado, generado durante su almacenamiento en pozas y transporte hacia los cocinadores en las fábricas de pescado. Sin embargo, estos residuos pueden ser aprovechados eficientemente si reciben un buen tratamiento para transformarlos (Gonzales y Marín, 2005).

Por lo que se considera importante evaluar la sanguaza de pescado como medio de cultivo de las algas microscópicas y en este sentido se ha evaluado a nivel de pre-experimental cuatro concentraciones de sanguaza/agua de mar (% v/v) en la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, caracterizada por la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), tiempo de generación (TG), fase lag (λ) y crecimiento máximo (a).

Asimismo se ha determinado por el Método de Superficie de Respuesta – Diseño Central Compuesto Rotacional (MSR - DCCR) la concentración de sanguaza/agua de mar que permite obtener la mayor producción de biomasa caracterizada por el máximo crecimiento (a) de *Tetraselmis suecica*.

2. Material y métodos

Se utilizó cepas de *Tetraselmis suecica* (Departamento de Biología, Microbiología y Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa, Ancash, Perú), agua destilada, C₂H₅OH, CH₃COOH, NaCl al 30 %, NaOH 0.1 N, lugol, aire comprimido, sanguaza del Terminal Pesquero 27 de Octubre, Bahía de Chimbote, Ancash, Perú (Tabla 1), agua de mar (Tabla 2). Medio Guillard F/2 (medio tradicional estandarizado, puro y químicamente definido) (Guillard, 1973). Microscopio óptico de 400x, cámara de Neubauer, autoclave, mufla, compresora.

Tabla 1
Análisis proximal de la sanguaza

Componente	Porcentaje (%)
Proteína	6.0
Grasa	4.0
Humedad	90.03
Ceniza	3.2
Sólidos totales	13.2

Tabla 2
Composición química de 1 litro de agua de mar

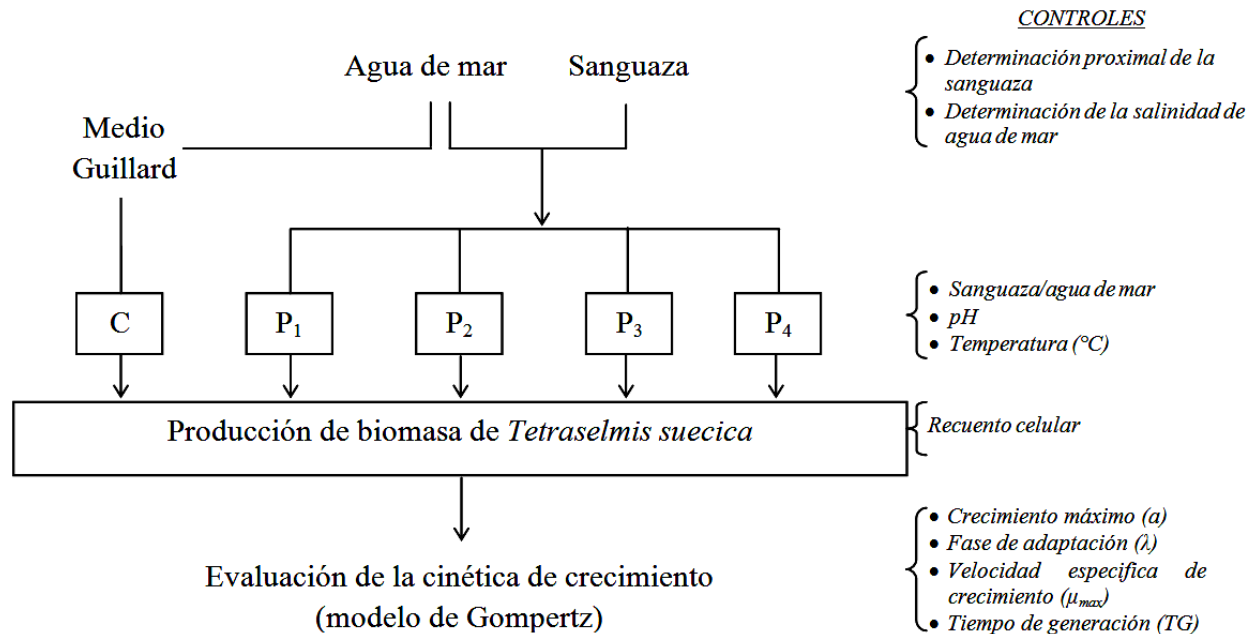
Componente	Cantidad
Cloruro de sodio	24.0 g
Cloruro de magnesio	5.0 g
Sulfato de sodio	4.0 g
Cloruro de calcio	1.1 g
Cloruro de potasio	0.7 g
Bicarbonato de sodio	0.2 g
Bromuro de sodio	0.096 g
Ácido bórico	0.026 g
Cloruro de estroncio	0.024 g
Fluoruro de sodio	0.003 g
Salinidad	34.5 %
pH	8.1

Durante el desarrollo experimental, se utilizó 4 concentraciones de sanguaza/agua de mar (2.5, 5, 10 y 20% v/v) y un experimento control (agua de mar sin sanguaza y medio Guillard F/2) (Figura 1). A cada una de los medios se le adicionó 250 mL de inóculo completando un volumen total de 1500 mL.

A los biorreactores se le introdujo aire con una compresora a flujo constante (0.07 L/s), con iluminación constante (2 fluorescentes de 40 watts). Durante el desarrollo de los cultivos se determinó el pH y temperatura; la variación de biomasa se realizó a través de tres conteos diarios de las células por mililitro, para lo cual se tomó una muestra de cultivo de 1 mL, la cual fue colocada en

cámara de Neubauer, fijándose con lugol, para evitar la movilidad de las células. El recuento se realizó con un microscopio óptico con aumento de 400x.

En la Tabla 3 se muestra el protocolo pre-experimental que se utilizó para delimitar el efecto de la concentración sanguaza/agua de mar en la producción de biomasa de *Tetraselmis suecica*.



LEYENDA:

- C: control con medio Guillard/agua de mar
- P1: concentración de sanguaza/agua de mar: 2.5% (v/v)
- P2: concentración de sanguaza/agua de mar: 5% (v/v)
- P3: concentración de sanguaza/agua de mar: 10% (v/v)
- P4: concentración de sanguaza/agua de mar: 20% (v/v)

Figura 1. Esquema pre-experimental para la evaluación del efecto de cuatro concentraciones de sanguaza/agua de mar en la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*.

Tabla 3

Protocolo pre-experimental de la composición de los medios de cultivo para *Tetraselmis suecica*

Medio de cultivo	Control	2.5 % (v/v)	5.0 % (v/v)	10.0 % (v/v)	20.0 % (v/v)
Sanguaza (mL)	0	31.25	62.5	125	250
Agua de mar (mL)	1250	1218.75	1187.5	1125	1000
Medio Guillard (mL)	1.25	0	0	0	0
Inóculo (<i>T. suecica</i>) (mL)	250	250	250	250	250

De los resultados obtenidos en la etapa pre-experimental se obtuvo los rangos de pH y concentración de sanguaza/agua de mar, planteándose en base a esto un diseño experimental utilizando MSR, con DCCR. Realizándose un planeamiento factorial completo 2^k , incluido 4 puntos axiales y cuatro puntos centrales, con lo que obtuvo un número total de 12 unidades experimentales. El exponencial k representa el número de variables independientes (k=2) pH y proporción sanguaza/agua de mar. Se utilizo el valor de α de 1.4142 (Rodríguez y Iemma, 2005), de acuerdo a:

$$\alpha \approx (2^k)^{1/4}$$

En la Tabla 4 se muestran los valores que fueron utilizados en el experimento principal sobre la base de las pruebas pre-experimentales desarrolladas (Figura 1):

Tabla 4

Valores usados en DCCR para las dos variables utilizadas

Variables	-1.41	-1	0	1	2
X ₁	2	2.44	3.5	4.56	5
X ₂	7	7.29	8	8.71	9

Donde:

X₁ = Concentración sanguaza/agua de mar (% v/v)

X₂ = pH

Con los valores de la Tabla 4 se elaboró la matriz (Tabla 5) en donde las variables respuesta fueron los parámetros de cinética de crecimiento: crecimiento máximo (a), fase de adaptación (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de generación (TG). Los volúmenes de sanguaza, agua de mar e inóculo para los diferentes tratamientos se presenta en la Tabla 6.

Para el desarrollo de la investigación se dispuso de agua de mar, la cual fue mezclada con sanguaza entre las concentraciones de 2.0 a 5.0% v/v (Tabla 3) y los valores de pH fueron ajustados entre 7.0 y 9.0, disponiéndose de un diseño experimental con 12 ensayos, los cuales fueron desarrollados para la evaluación de producción de biomasa a través de la cinética de crecimiento de un proceso fotosintético. La secuencia del desarrollo experimental se observa en la Figura 2.

Tabla 5

Valores codificados para las variables independientes y respuesta (cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*)

Tratamiento	X ₁ (concentración sanguaza/agua de mar)		X ₂ (pH)		Variables respuesta (cinética de crecimiento)			
	Código	Real (% v/v)	Código	Real	a	λ	μ_{max}	TG
1	-1	2.44	-1	7.29	a ₁	λ_1	μ_1	TG ₁
2	1	4.56	-1	7.29	a ₂	λ_2	μ_{12}	TG ₂
3	-1	2.44	1	8.71	a ₃	λ_3	μ_{13}	TG ₃
4	1	4.56	1	8.71	a ₄	λ_4	μ_{14}	TG ₄
5	0	3.50	-1.4142	7.00	a ₅	λ_5	μ_{15}	TG ₅
6	0	3.50	1.4142	9.00	a ₆	λ_6	μ_{16}	TG ₆
7	-1.4142	2.00	0	8.00	a ₇	λ_7	μ_{17}	TG ₇
8	1.4142	5.00	0	8.00	a ₈	λ_8	μ_{18}	TG ₈
9	0	3.50	0	8.00	a ₉	λ_9	μ_{19}	TG ₉
10	0	3.50	0	8.00	a ₁₀	λ_{10}	μ_{10}	TG ₁₀
11	0	3.50	0	8.00	a ₁₁	λ_{11}	μ_{11}	TG ₁₁
12	0	3.50	0	8.00	a ₁₂	λ_{12}	μ_{12}	TG ₁₂

Durante el desarrollo experimental posterior a la preparación de las doce (12) concentraciones de sanguaza/agua de mar, se ajustó los valores de pH, los cuales fueron controlados y ajustados durante todo el proceso con NaOH 0.1 N y CH₃COOH 0.1 N. Se realizó dos conteos diarios por microscopia de la producción de biomasa microbiana (células/mL), tomándose 1 mL como muestra, la cual se colocó en cámara de Neubauer y fijándose con lugol para evitar el movimiento de las microalgas durante el recuento en la lámina portaobjetos.

Igualmente en esta etapa se evaluó la cinética de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz (Nakashima *et al.*, 2000), lo que permitió determinar la cinética de crecimiento a través del crecimiento máximo (α), fase lag o de adaptación (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de generación (TG). Haciendo uso de MSR a través de un DCCR, se evaluó el efecto del pH y la concentración de sanguaza/agua de mar en la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*. Se realizó un ANVA para verificar si

el modelo matemático fue significativo ($p < 0.05$), así como la determinación del nivel del coeficiente de determinación R². La producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* se realizó de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 3.

Tabla 6
Volúmenes de sanguaza, agua de mar e inóculo

Tratamientos	Sanguaza (mL)	Agua de mar (mL)	Inóculo (mL)
1	21.96	878.04	100
2	41.04	858.96	100
3	21.96	878.04	100
4	41.04	858.96	100
5	31.50	868.50	100
6	31.50	868.50	100
7	18.00	882.00	100
8	45.00	855.00	100
9	31.50	868.50	100
10	31.50	868.50	100
11	31.50	868.50	100
12	31.50	868.50	100

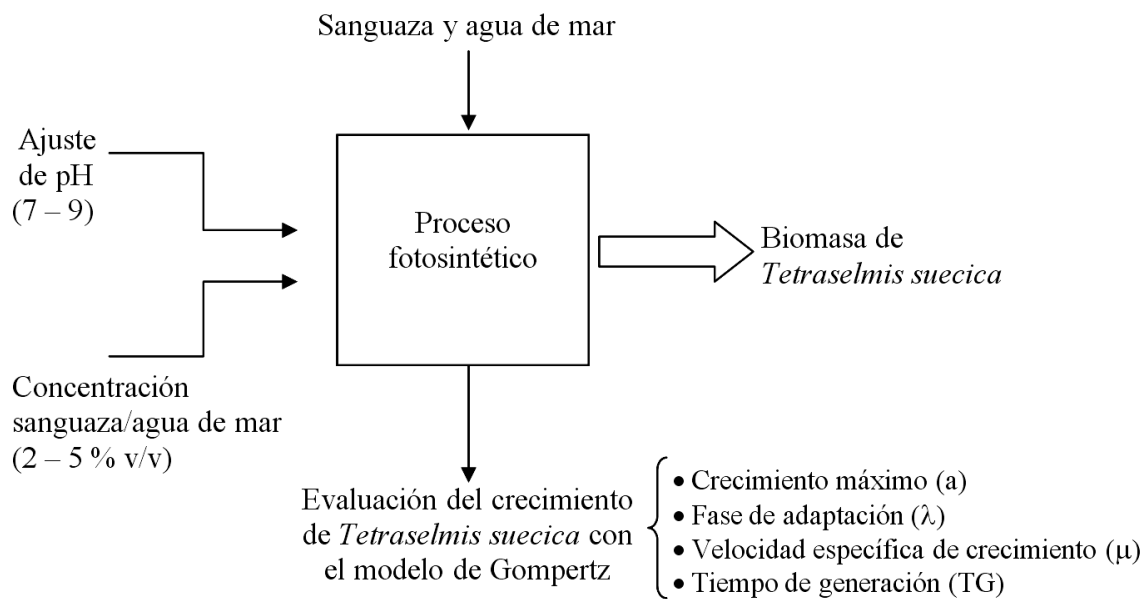


Figura 2. Esquema del experimento principal para la evaluación del efecto del pH y concentración sanguaza/agua de mar en la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*.

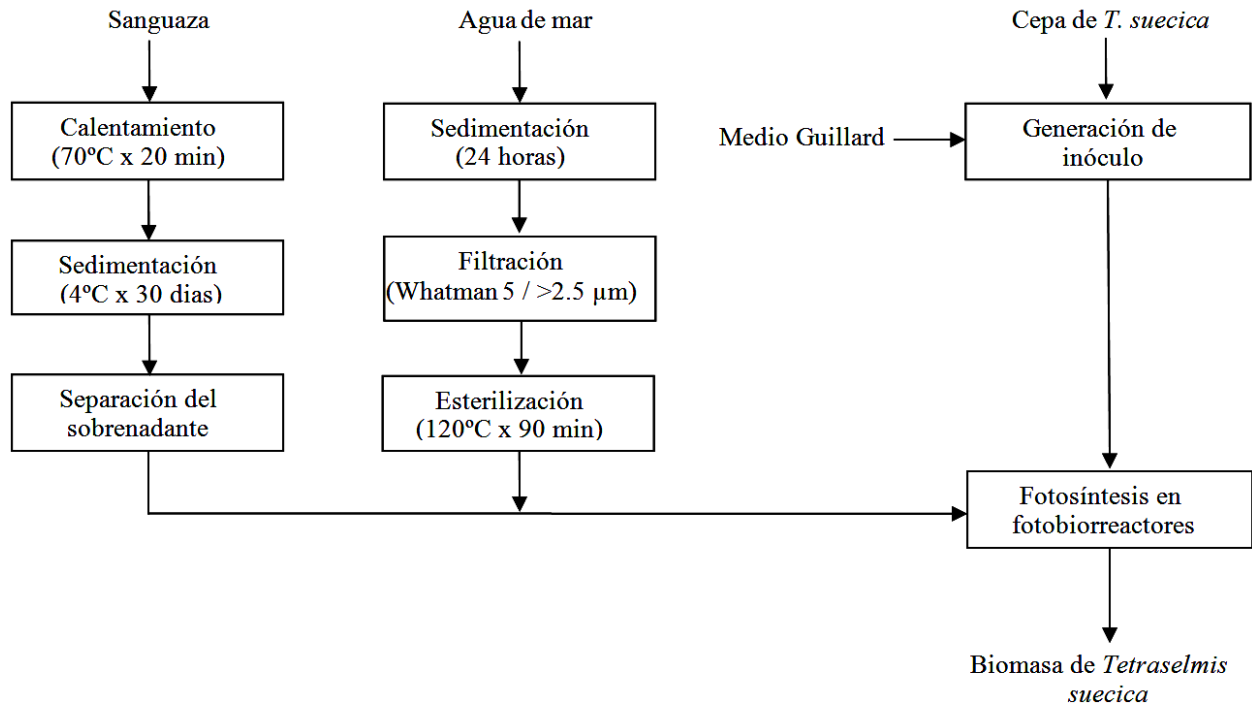


Figura 3. Diagrama de flujo de producción de biomasa de *Tetraselmis suecica*

3. Resultados y discusión

3.1. Resultados del pre-experimento

Se analizó la cinética de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz, determinándose los valores de los parámetros (a, b y c), así como los valores de la fase lag o adaptación (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}), tiempo de generación (TG). Los rangos de pH observados fueron determinados entre 7.13 y 8.69 y la temperatura fluctuó entre 21 y 24°C. Se reporta experiencias de buen crecimiento de *Tetraselmis suecica* a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Serdar *et al.*,

2007). Coll-Morales (1983) indican una temperatura óptima de 18°C; Laim y Helm (1981) mencionan que la productividad de *T. suecica* no es afectada por temperatura de 18-22°C, disminuyendo si la fuente de dióxido de carbono es insuficiente para mantener el pH igual o inferior a 7.8. Se reporta cultivos de *T. Suecica* en intervalos de pH de 7.3 a 8.5 (Millán-Núñez *et al.*, 2010). Helm y Laing (1981) reportan una intensidad lumínica óptima de 40000 Lux (6 lámparas). Se determinó un $p < 0.05$ para el recuento celular y para el pH en todos los ensayos incluidos el control.

Tabla 7

Valores de los parámetros de la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica* ajustado al modelo de Gompertz en la etapa pre-experimental

Tratamientos	a	b	c	λ	μ_{\max}	TG	R
Control	0.30	9.51	0.08	109.66	0.023	12.88	0.79
P1 (2.5% v/v)	0.39	4.01	0.06	50.16	0.023	12.96	0.96
P2 (5.0% v/v)	0.46	9.25	0.11	71.98	0.053	5.68	0.97
P3 (10.0% v/v)	0.33	44.24	0.05	869.17	0.016	18.48	0.91
P4 (20.0% v/v)	-0.27	15.76	0.01	128.78	-0.031	-9.59	0.46

En la Tabla 7 se aprecia que los mejores tratamientos para la producción de biomasa fueron los tratamientos P₁ y P₂, con concentraciones sanguaza/agua de mar de 2.5 y 5.0% respectivamente, donde se observa una menor fase de adaptación o fase lag (λ) de 50.16 y 71.98 horas, una mayor velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) de 0.023 h⁻¹ y 0.053 h⁻¹, un menor tiempo de generación (TG) de 12.96 y 5.68, un crecimiento máximo (a) de 0.39 y 0.46 respectivamente; con elevados valores de coeficiente de correlación R₁ = 0.96 y R₂ = 0.97, mientras que para los tratamientos P₃=10% y P₄=20% de concentración de sanguaza/agua de mar, los valores obtenidos en toda la cinética de crecimiento fueron inferiores; incluyendo los coeficientes de correlación, R₃=0.91 y R₄=0.46 respectivamente. Rodríguez *et al.*, (2007) reportan experiencias con buenos resultados utilizando 20% de salinidad. Se puede notar que el tratamiento 4 tuvo limitaciones de crecimiento por la presencia de una alta proporción de sanguaza, que le confiere un color oscuro al medio, lo que no permite una adecuada iluminación limitando el proceso fotosintético (Coll-Morales, 1983). Asimismo se puede observar que el control con medio Guillard no se ajusta adecuadamente al modelo de Gompertz, lo que contrasta con lo afirmado por Guillard (1973) y Herrero *et al.* (1994) quienes sostienen que este medio es adecuado para el cultivo de microalgas marinas por el aporte de macro y micronutrientes.

En este contexto Sánchez *et al.* (2008) encontraron que un ensilado de pescado no hidrolizado, proporciona buena productividad de la microalga *Nannochloropsis oculata*, en relación a la obtenida cuando se usan los medios de cultivo Yashima y Guillard F/2. El ensilado de pescado fue obtenido mediante un proceso de fermentación ácido láctico con melaza como fuente de carbono.

Rodríguez *et al.* (2007) investigaron el empleo del medio EM-Bokashi con

Tetraselmis suecica, obteniendo un buen crecimiento poblacional en relación a los medios Yashima y Guillard modificado. Asimismo determinaron que el medio EM-Bokashi proporciona un menor costo de producción (98.8% menor que cuando se usa el medio Yashima). Este medio es un fertilizante orgánico, obtenido mediante fermentación de materia orgánica por acción de microorganismos eficaces (EM), confiriendo propiedades probióticas. Sostienen que la presencia de probióticos compete con las bacterias patógenas inhibiendo su desarrollo, lo que contribuye al equilibrio ecológico del medio.

3.2. Resultados del experimento principal

En el Tabla 8 se presentan los valores de a, b y c para los 12 tratamientos del experimento principal, obtenidos aplicando el modelo matemático de Gompertz [$YA = a \cdot \exp(-\exp(b - c \cdot TA))$], donde $YA = \log(N/N_0)$ y $TA =$ tiempo en h], así como los parámetros de la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, comprendidos por la fase lag o de adaptación (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}), tiempo de generación (TG); así como el coeficiente de correlación R. Los valores de R obtenidos en todos los ajustes variaron entre un mínimo de 0.93 y 0.99, lo que indica el buen ajuste de los datos experimentales.

Los valores que se presentan en Tabla 8 fueron usados en el DCCR para la obtención de la Superficie de Respuesta. En la Tabla 9 se presentan los coeficientes de regresión de la fase lag, velocidad específica de crecimiento, tiempo de generación y crecimiento máximo; lo que permite obtener modelos matemáticos de 2º orden, pasibles de corregirse cuando $p < 0.05$, los cuales mostraron baja capacidad de predicción de la fase lag entre los valores experimentales y los predichos con un R² de 79.2% conforme se observa en la Figura 4.

Tabla 8

Valores de los parámetros de la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica* ajustado al modelo de Gompertz en el experimento principal

Tratamientos	a	b	c	λ	μ_{\max}	TG	R
1	0.61	2.72	0.03	56.70	0.019	37.33	0.97
2	0.57	3.29	0.04	57.89	0.023	30.68	0.99
3	0.56	2.36	0.04	30.88	0.025	27.98	0.95
4	0.66	2.53	0.04	41.13	0.025	28.29	0.97
5	0.55	3.87	0.04	66.55	0.024	29.40	0.93
6	0.63	3.28	0.04	62.16	0.023	29.93	0.97
7	0.53	3.16	0.05	40.74	0.028	24.86	0.99
8	0.58	2.87	0.04	43.37	0.025	27.91	0.97
9	0.62	3.69	0.07	39.11	0.043	16.24	0.98
10	0.62	4.69	0.08	43.82	0.052	13.21	0.98
11	0.63	3.89	0.07	42.07	0.043	16.11	0.98
12	0.64	3.82	0.07	40.41	0.044	15.59	0.98

Tabla 9

Coefficientes de regresión para la fase lag (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) y tiempo de generación (TG) y crecimiento máximo (a) de *Tetraselmis suecica*

Parámetro	Fase lag (λ)		Velocidad específica de crecimiento (μ_{\max})		Tiempo de generación (TG)		Crecimiento máximo (a)	
	Coefficiente	P	Coefficiente	P	Coefficiente	P	Coefficiente	P
Intercepción	1431.995	0.001	-1.61216	0.008	1181.576	0.001	-0.144482	0.752
(1) pH (L)	-333.628	0.001	0.38044	0.008	-264.180	0.001	0.226657	0.104
pH (Q)	19.655	0.001	-0.02338	0.008	15.883	0.001	-0.022228	0.034
(2) Prop% (L)	-14.153	0.323	0.07478	0.070	-57.927	0.001	-0.156630	0.039
Prop% (Q)	-1.163	0.204	-0.00906	0.011	5.595	0.001	-0.026685	0.002
1L por 2L	30.010	0.113	-0.00143	0.672	2.315	0.090	0.044846	0.003

(L) = Lineal (Q) = Cuadrático

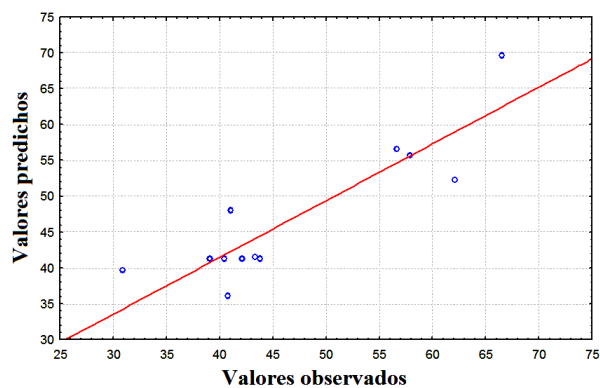


Figura 4. Valores esperados y predichos para la fase lag (λ) o de adaptación por el modelo matemático

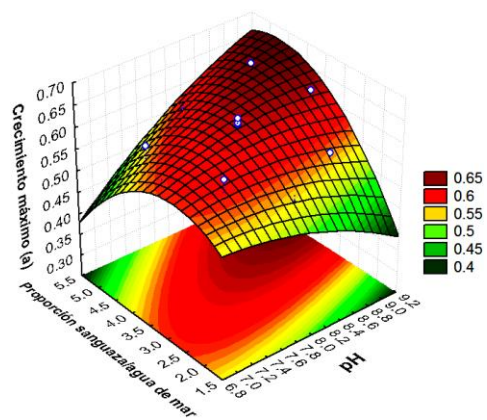


Figura 5. Superficie de Respuesta del crecimiento máximo (a) de *Tetraselmis suecica* en función del pH y concentración sangüaza/agua de mar (% v/v)

Desde el punto de vista de producción de biomasa el crecimiento máximo (a) es un elemento importante. En la Figura 5 se observa la Superficie de Respuesta de crecimiento máximo en función al pH y concentración sanguaza/agua de mar, notándose a partir de un pH de 8.0 y de una concentración sanguaza/agua de mar de 3.5% (v/v), permiten alcanzar un crecimiento máximo. Los valores experimentales con los valores predichos para el crecimiento máximo (a) mostraron un R^2 de 84.9% cuyo nivel de dispersión se muestra en la Figura 6.

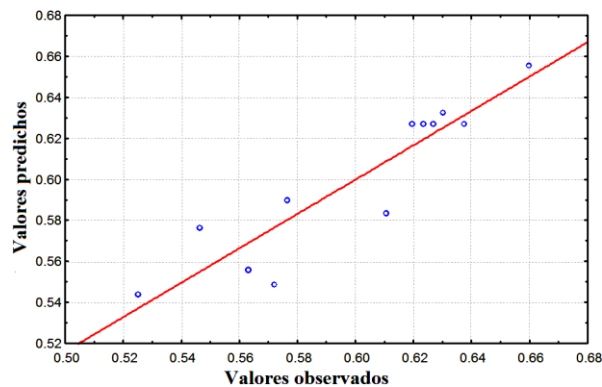


Figura 6. Valores esperados y predichos para el crecimiento máximo (a) por el modelo matemático.

De acuerdo al tratamiento experimental 4 con un pH de 8.71 y una concentración sanguaza/agua de mar de 4.56% (v/v) se obtuvo una cinética de crecimiento mostrada en la Figura 7. Observándose un valor de crecimiento máximo ($\log N/N_0$) de 0.659 y utilizando el modelo matemático que proyecta la MSR se obtiene un valor de 0.73 (error de 12.3%).

El uso de agua de mar con sanguaza, ha demostrado ser una buena alternativa para la producción de biomasa de *Tetraselmis suecica*, considerando que la sanguaza es un residuo, cuyo costo es menor que el medio EM-Bokashi y obviamente que el medio Yashima. El medio Bokashi está constituido por 50% de salvado de trigo, 30% de harina

de soja, 18% de cebadina, 2% de carbón vegetal, 1% de EM activado (10% de EM puro + 10% de melaza + 80% de agua) (Rodríguez *et al.*, 2007). La composición de la sanguaza podría variar dependiendo de la incorporación del tipo de residuos y de las operaciones durante el procesamiento de pescado. Sin embargo queda abierta la posibilidad de evaluar la eficiencia del medio EM- Bokashi y con respecto a la sanguaza.

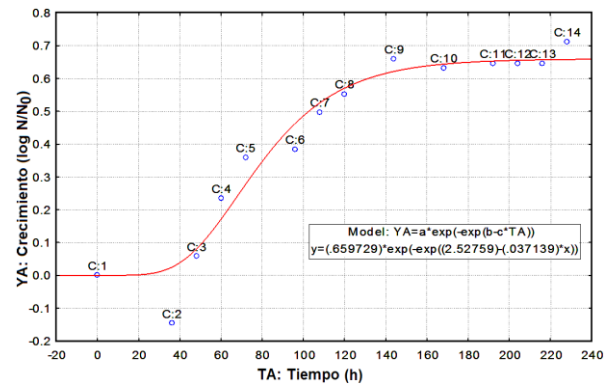


Figura 7. Curva suavizada por el modelo de Gompertz para el tratamiento 4 con pH = 8.71 y concentración sanguaza/agua de mar de 4.56%.

4. Conclusiones

Se evaluó a nivel pre-experimental cuatro concentraciones sanguaza/agua de mar (2.5, 5, 10 y 20% v/v) en la cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, determinándose que los rangos de pH y concentración de sanguaza/agua de mar de 7 - 9 y 2 - 5% (v/v) respectivamente, permiten obtener la mejor cinética de crecimiento de *Tetraselmis suecica*, caracterizada por una menor fase de adaptación o fase lag (λ) de 50.16 y 71.98 h, una mayor velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de $0.023\ h^{-1}$ y $0.053\ h^{-1}$, un menor tiempo de generación (TG) de 12.96 y 5.68 h, un crecimiento máximo (a) con valores de: 0.39 y 0.46 respectivamente, con elevados valores de coeficiente de correlación $R_1 = 0.96$ y $R_2 = 0.97$. Se determinó por el Método de Superficie de Respuesta (MSR) con un

Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR), utilizando el modelo matemático de Gompertz, que a partir de un pH de 8.0 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 3.5% (v/v) se logra un crecimiento máximo de *Tetraselmis suecica*. Un pH de 8.71 y una concentración de sanguaza/agua de mar de 4.56% (v/v) permite obtener un crecimiento máximo ($\log N/N_0$) de 0.659 de *Tetraselmis suecica*, obteniéndose una predicción con un 12.3% de error con un modelo matemático de 2° orden.

Referencias

- Álvarez, M.; Zarco, J. 1989. Lipids in Microalgae. A review I. Biochemistry. *Grasas y Aceites* 40(2): 118-145.
- Álvarez, M. 1989. Lipids in Microalgae. A review II. Environment. *Grasas y Aceites* 40(3): 213-223.
- Bermejo, R.; Álvarez P.; Acien, F.; Molina, G. 2002. Recovery of pure N-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93:73-85.
- Bold, H.; Wynne, M. 1985. Introduction to the Algae. New Jersey: Prentice Hall. USA.
- Coll-Morales, J. 1983. Acuicultura Marina Animal. Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Díaz, A.; Ramírez, A.; Godínez, D.; Gallo, C. 2006. Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical* 24(2): 193-203.
- González, D.; Marín, M. 2005. Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos del procesamiento de sardinas. *Revista Científica FCV-LUZ* 15(6): 560-567.
- Guillard, R. 1973. Handbook of physiological methods. J. R. Stein Cambridge University press. London. England.
- Guschina, I.; Harwood, J. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45:160-186.
- Helm, M.; Laing, I. 1981. Cost effective culture of marine unicellular algae. In F. Vogt (Edit), *Energy Conservation and Renewable Energies in the Bio-industries*. Pergamon Press, Oxford and New York: 247-259.
- Herrero, C.; Cid, A.; Fabregas, J.; Abalde, J. 1994. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering* 10: 99-110.
- Hirata, K.; Tsujimoto, Y.; Namba, T.; Ohta, T.; Hirayanagi, N.; Miyasaka, H.; Zenk, M.H.; Miyamoto, K. 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green algae, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 24-29.
- Knothe, G.; Dunn, R.; Bagby, M. 1997. Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels. *ACS Symp Ser.* 666: 172-208.
- Laing, I.; Helm, M. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. in 200-l vessels. *Aquaculture* 22: 137-148.
- Lee, Y.K. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology* 9: 403-411.
- Millán-Núñez, R.; Valenzuela-Espinoza, E.; Trees, C.; Santamaría del Ángel, E.; Núñez, F. 2010. Efecto de la intensidad de luz en la razón de pigmentos de *Tetraselmis suecica*. *Revista Acuicultura*. Disponible en: <http://promepsol.sep.gob.mx/archivospdfs/produccion/Producto773306.PDF>
- Mora, R.; Moronta, R.; Ortega, J. Morales, E. 2005. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia Completa*: 1-9.
- Nakashima, S.; André, C.; Franco, B. 2000. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology* 3:41-51.
- Rodríguez, L.; Juscamaita, J. Vargas, J. 2007. Efecto del medio EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. *Ecología Aplicada* 6: 111-116.
- Rodríguez, M.; Iemma, A. 2005. Planeamiento de experimentos y optimización de procesos. Edit. Casa do Pao. Brasil.
- Sánchez, H.; Juscamaita, J.; Vargas, J.; Oliveros, R. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada* 7: 149-158.
- Serdar, S.; Lök, A.; Acarli, S.; Köse, A. 2007. The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 38: 394.
- Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J.; Roessler, P. 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae. Disponible en: <http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>