

Crecimiento de *Tetraselmis* sp. empleando fertilizante como medio de cultivo

Carolina Montoya-Vallejo^{1*}; Alejandro Acosta-Cárdenas²

¹ Facultad de Ingeniería, Grupo de Bioprocesos, ² Escuela de Microbiología, Grupo de Biotransformación, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53 – 108. Medellín, Colombia.

* carolina.montoya1@udea.edu.co

Fecha recepción: octubre 6 de 2020
Fecha aceptación: marzo 17 de 2021

Resumen

Las microalgas juegan un rol muy importante en la cadena alimenticia de la acuicultura, ya que estas son utilizadas en la nutrición y cría de moluscos, camarones y peces en sus diferentes etapas de crecimiento. *Tetraselmis* sp., es una microalga reconocida por sus aplicaciones como alimento vivo en acuicultura y sus parámetros de crecimiento pueden variar de acuerdo a las condiciones de cultivo. En este sentido, fueron evaluadas diferentes condiciones de crecimiento como medio de cultivo empleado, fertilizante comercial, fotoperiodo (12:12 y 24:0) y salinidad (0-55 gL⁻¹) para obtener diferentes parámetros cinéticos de crecimiento. Las mejores condiciones de cultivo se alcanzaron con un fertilizante comercial, un fotoperiodo 12:12, salinidad del 35 gL⁻¹, una velocidad específica de crecimiento de 1,071 d⁻¹, tiempo de duplicación de 0,64 días, rendimientos (Yx/s) de biomasa respecto al consumo de nitrato, fósforo y amonio de 4,3; 37,7; 10,5 (gg⁻¹) respectivamente, con un contenido de proteínas del 55% (p/p). Adicionalmente, se evaluó el modelo de Gompertz para la producción de biomasa presentando un buen ajuste (r²=0,9) entre el modelo y los resultados experimentales.

Palabras clave: *Tetraselmis* sp.; Medio de cultivo; Fotobiorreactor; Acuicultura; Gompertz.

Growth of *Tetraselmis* sp. using fertilizer as culture medium

Abstract

Microalgae play a very important role in the food chain of aquaculture, they have already been used in the nutrition and breeding of mollusks, shrimps and fish in their different stages of growth. *Tetraselmis* sp. is a recognized microalgae for its applications as live feed in aquaculture and its grow could vary according to the culture conditions. In this sense, different growing conditions such as culture medium, commercial fertilizer, photoperiod (12:12 and 24:0) and salinity (0-55 gL⁻¹) were evaluated to obtain different growth kinetic parameters. The best growing conditions were achieved with a commercial fertilizer, a 12:12 photoperiod, salinity of 35 gL⁻¹, a specific growth rate of 1.071 d⁻¹, doubling time of 0.64 days, yields (Yx/s) of biomass with respect to the consumption of nitrate, phosphorus and ammonium of 4.3; 37.7; 10.5 (gg⁻¹) respectively, with a protein content of 55% (w/w). In addition, the Gompertz model for biomass production was evaluated, presenting a good fit ($r^2 = 0.9$) between the model and the experimental results.

Keywords: *Tetraselmis* sp.; Culture medium; Photobioreactor; Aquaculture; Gompertz.

Crescimento de *Tetraselmis* sp. usando fertilizante como meio de cultura

Resumo

As microalgas são muito importantes na dieta alimentar da acuicultura, são aquelas que são utilizadas na nutrição e criação de moluscos, camarões e peixes em diferentes fases de crescimento. *Tetraselmis* sp. é uma microalga reconhecida por suas aplicações como ração viva na aquicultura e seus parâmetros de crescimento podem variar de acordo com as condições de cultivo. Neste sentido, foram avaliadas diferentes condições de crescimento como meio de cultivo em fertilizante comercial, fotoperíodo (12:12 y 24: 0) e salinidade (0-55 gL⁻¹) a fim de obter diferentes parâmetros cinéticos de crescimento. As melhores condições de cultivo foram obtidas com fertilizante comercial, fotoperíodo 12:12, salinidade de 35 gL⁻¹, taxa de crescimento específico de 1,071 d⁻¹, tempo de duplicação de 0,64 dias, rendimento (Yx/s) biomassa em relação ao consumo de nitrato, fósforo e amônio de 4,3; 37,7; 10,5 (gg⁻¹) respectivamente, porcentagem de proteína 55% (p/p). Adicionalmente, o modelo de Gompertz foi avaliado para produção de biomassa apresentando um bom ajuste ($r^2 = 0,9$) entre o modelo e os resultados experimentais.

Palavras-chave: *Tetraselmis* sp.; Meio de cultura; Fotobioreactor; Aquicultura; Gompertz.

Introducción

Las microalgas, son un grupo muy diverso de microorganismos, tanto en tamaño como en morfología, son una fuente de una amplia variedad de productos químicos con aplicaciones en alimentos como suplementos nutricionales, cosméticos, farmacéuticos e incluso biocombustibles. Debido a la composición nutricional de su biomasa se derivan sus aplicaciones para la producción de suplementos nutricionales para humanos y animales y gracias a sus pigmentos carotenoides son utilizados en el sector avícola y piscícola dando valor agregado a carnes y huevos. Adicionalmente, su capacidad fotosintética le permite capturar dióxido de carbono y por lo tanto son fijadoras biológicas de este gas de efecto invernadero [1, 2].

En los últimos años se ha incrementado el uso de las microalgas como alimento en acuicultura por su alto valor alimenticio, buena digestibilidad, buen perfil de aminoácidos entre otras características. *Tetraselmis* sp. es un género de microalga de gran aplicación en acuacultivos, como alimento de peces y camarones especialmente en sus estados larvarios, rotíferos y crustáceos, gracias a su composición bioquímica, tamaño y facilidad para el cultivo [3].

Para el cultivo de microalgas hay parámetros muy importantes a considerar y con ello garantizar un adecuado crecimiento de la biomasa, es así como en cultivos fotoautotróficos el medio de cultivo, la luz (fotoperiodo, tipo de luz e intensidad lumínica), la fuente de carbono, el oxígeno, salinidad, temperatura y el pH se convierten en parámetros de gran importancia para la generación de biomasa.

El estudio de estos factores no sólo está orientado al entendimiento de los procesos sino también a incrementar las productividades y concentraciones finales de biomasa o producto de interés. A ello se suma que, en aplicaciones comerciales de la microalga *Tetraselmis* sp., es necesario minimizar los costos del medio de cultivo, de los requerimientos nutricionales o de la producción de la microalga sin afectar la concentración final de biomasa [2, 3]. El conocimiento y control de los parámetros ambientales en los cultivos microalgales no sólo permiten la supervivencia y desarrollo de los organismos, sino además, factores como la temperatura y la salinidad regulan la concentración de vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos [4].

En Colombia las experiencias con esta especie son relativamente pocas y por ello el interés de identificar las condiciones que más favorecen su cultivo para su posterior aplicación como alimento vivo en la

acuicultura. En este trabajo, se presentan los resultados del efecto de las condiciones de cultivo relacionadas con la evaluación de un fertilizante comercial y del medio F/2 de Guillard como medio de referencia, la salinidad del medio de cultivo (0-50 gL⁻¹) y fotoperiodo (luz/oscuridad, 24:0, 12:12) de la microalga *Tetraselmis* sp.; además, se analizó la composición bioquímica de la microalga de acuerdo al contenido de proteínas y carbohidratos, sumado a un perfil de aminoácidos. Finalmente, se evaluó el modelo de Gompertz para describir los comportamientos experimentales observados durante el crecimiento de la biomasa.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa de *Tetraselmis* sp., fue donada al grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia por el laboratorio de alimento vivo del Acuario del Parque EXPLORA. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo por 12 días, a una temperatura 25 ± 2 °C. La intensidad lumínica se suministró con lámparas blancas fluorescentes de 17 W, 1200 lux (14 mmolm⁻²s⁻¹), todos los cultivos se realizaron por triplicado. El inóculo fue 10% del volumen de trabajo en cada experimento [5].

Condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo estudiados fueron: F/2 de Guillard (Micronutrientes (mgL⁻¹): Na₂EDTA 41,6; FeCl₃·6H₂O 3,15; CuSO₄·5H₂O 0,01; ZnSO₄·7H₂O 0,022; CoCl₂·6H₂O 0,01; MnCl₂·4H₂O 0,18; NaMoO₄·2H₂O 0,006, Vitaminas (ugL⁻¹): Cianobalamina (B12) 0,5; Tiamina HCl (B1) 100; Biotina 0,5; Macronutrientes (gL⁻¹): NaNO₃ 0,075; NaH₂PO₄·2H₂O 0,00565; NaCl 21,08; MgSO₄·7H₂O 5,18; MgCl₂·6H₂O 4,12; CaCl₂·2H₂O 1,06; KCl 0,5 [6], medio estándar de microalgas marinas más reportado en la literatura y Fertilizante agrícola Crecilizer® (N: 20% P₂O₅: 10% K₂O: 10%), de fácil preparación y bajo costo. Todos los medios se prepararon en agua de mar artificial con 27% de salinidad. Para la evaluación de los medios de cultivo se realizó un diseño experimental unifactorial y de manera similar se evaluaron diferentes concentraciones de fertilizante (0,03; 0,1; 0,4; 0,7; 1,0 mL⁻¹ de fertilizante), cuando se empleó 0,1 mL⁻¹ de fertilizante este es equivalente a la concentración de nitrógeno del medio de referencia F/2 de Guillard.

Para determinar el tiempo de duplicación (td) y la productividad (Qx), se emplearon las ecuaciones (1) y (2). Donde Xmax, Xo, corresponden a biomasa máxima alcanzada y biomasa inicial, respectivamente. El rendimiento biomasa sustrato se calculó usando la Ecuación (3).

$$td = \text{Ln}(2)/u \quad (1)$$

$$Q_x = \frac{X_{\max} - X_0}{t} \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = X_{\max} - X_0 / \text{Sustrato consumido} \quad (3)$$

Cultivo en Columna de burbujeo y modelo de Gompertz

Los montajes se realizaron en una columna de burbujeo de 4L, modular, dimensiones altura: 115,5 cm, Diámetro: 10,5 cm, relación altura-diámetro L/D: 11, relación superficie volumen S/V: 0,38 cm⁻¹, elaborado en vidrio de alta resistencia al calor (esterilizable con vapor). Para el suministro de luz, las lámparas fueron ubicadas a los lados del FBR proporcionando una intensidad de 1200 lux (14,4±5 μmol m⁻² s⁻¹) [7]. Se adicionaron 800 mL de inóculo con una densidad de 1,2±0,3 millones de células mL⁻¹, la aireación fue continua (0,1VVM). Al iniciar los cultivos se ajustó el pH adicionando bicarbonato de sodio y para el control de pH se realizaron pulsos de CO₂. Se hicieron mediciones diarias de pH (pH-metro WTW pH 320/set 1), biomasa [5], nitratos [8] y fosfatos [9], por técnicas espectrofotométricas. Así como el contenido de proteína y carbohidratos de la biomasa al final del cultivo, además de la clorofila y los carotenoides, también mediante técnicas espectrofotométricas [5]. Las variables de respuesta fueron la velocidad específica de crecimiento y productividad; la primera se determinó a partir de un ajuste de los puntos de la cinética al modelo Gompertz (Ecuación 4), empleando los datos de biomasa en células mL⁻¹ modificados con logaritmo natural [10], la productividad se determinó mediante la Ecuación 3 [11]. Para el ajuste de los resultados se empleó el toolbox de ajuste de curvas de Matlab r2008a.

$$y = A \exp \left[-\exp \left(\frac{\mu_m * \exp(1)}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right] \quad (4)$$

Tabla 1. Nomenclatura de la Ecuación 5 de modelo Gompertz para el crecimiento celular.

Parámetro	Definición
x	Biomasa en un tiempo determinado
x ₀	Biomasa inicial
y	Ln(x/x ₀)
t	Tiempo
A	Valor asintótico, valor de ln(x/x ₀) máximo ajustado
μ _m	Velocidad específica de crecimiento máxima
λ	Duración de la fase de adaptación

Técnicas analíticas

La concentración celular se determinó por absorbancia a 440 nm (Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios α), empleando una curva de calibración para peso seco y para conteo celular a partir de muestras de 1 mL. Se realizó un seguimiento periódicamente para la cuantificación de células por conteo celular al microscopio, empleando una cámara de Neubauer [5].

La concentración de nitratos se determinó por el método espectrofotométrico [8], basado en la absorbancia del nitrato a la longitud de onda 220 nm en el espectro UV. La concentración de amonio se determinó por el método espectrofotométrico de Nessler [12]; para evitar la interferencia por las sales presentes en el medio, se realiza una precipitación de estas por la adición de sulfato de zinc a pH 10,5 y se centrifuga, al sobrenadante se le agrega sal de Rochelle y reactivo de Nessler, después de 10 minutos se lee la absorbancia a 425 nm. La clorofila a, b y los carotenos fueron determinados por el método propuesto por Strickland-Parsons [5], se emplearon las ecuaciones (6) y la acetona al 90% como solvente. Las muestras fueron de 2,0 mL y se empleó 2,0 mL de solvente.

$$\text{Clorofila-a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 11,93A_{664} - 1,93A_{647}$$

$$\text{Clorofila-b} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 120,36A_{647} - 5,50A_{664} \quad (5)$$

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 7,6(A_{480} - 1,49A_{510})$$

Para la determinación de fosfatos se utilizó un método espectrofotométrico, midiendo la absorbancia a 828 nm [9]. El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Lowry modificado para microalgas [13]. Los carbohidratos se determinaron mediante la medición de azúcares reductores con el método de DNS, previa hidrólisis básica [5]. El análisis de aminoácidos se realizó mediante HPLC, utilizando una columna Agilent Zorbax Eclipse AAA. Previa hidrólisis de la muestra con HCl 6N [14].

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron empleado StatGraphics 5.0 plus. Se emplearon como variables respuesta, velocidad específica de crecimiento, productividad, concentración de biomasa, clorofila y carotenos. Todos los experimentos y análisis de las variables se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Medio de cultivo y salinidad

Antes de evaluar las diferentes condiciones de crecimiento de la microalga se evaluó el nivel de salinidad de los cultivos, empleando como variable de respuesta la velocidad específica de crecimiento sobre el medio de cultivo de referencia. Los resultados obtenidos (Figura 1) respecto a la salinidad están de acuerdo a otros autores, que reportan las salinidades óptimas para *Tetraselmis* sp. en el rango de 25 a 35 g L⁻¹ [15]. Para nuestro caso la mayor velocidad específica de crecimiento se alcanzó a los 35 g L⁻¹ tal y como se aprecia en Figura 1, mientras que a concentraciones mayores o menores la velocidad disminuyó. El estrés salino es uno de los factores limitantes en el crecimiento y productividad de los microorganismos. Los mecanismos de estrés hiperosmótico en varias microalgas inactivan la maquinaria fotosintética. *Tetraselmis* sp. ha demostrado capacidad de crecer en concentraciones salinas entre 20 y 50 g L⁻¹. La disminución en el crecimiento a altas salinidades puede deberse al decrecimiento en la maquinaria fotosintética [16,17].

Respecto al medio de cultivo (Figura 2), se observa la productividad y la velocidad específica de crecimiento como variables de respuesta, sobre los medios de cultivo fertilizante y el medio de referencia (F/2 de Guillard).

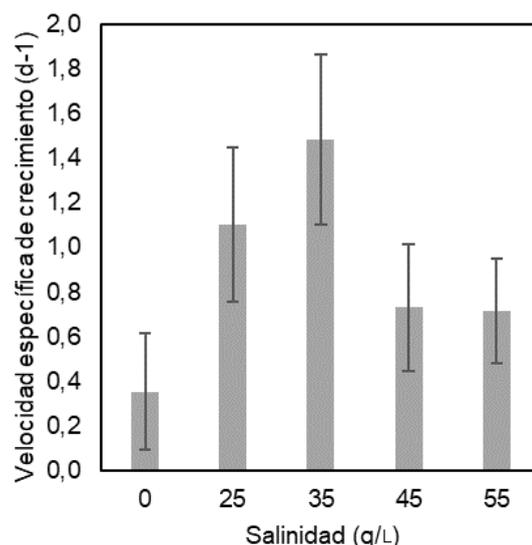


Figura 1. Velocidad específica de crecimiento de *Tetraselmis* sp. en función de la concentración salina.

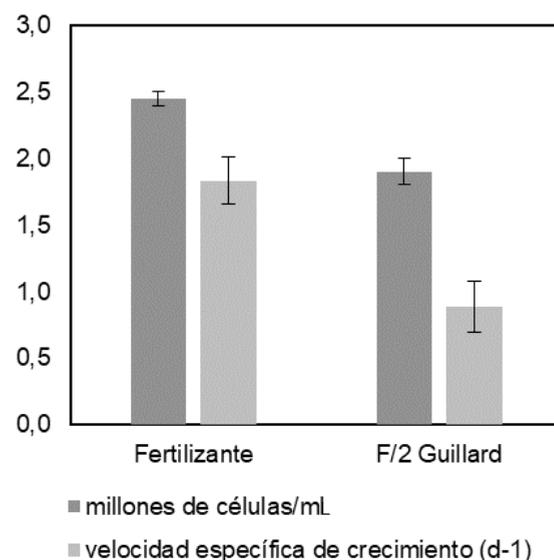


Figura 2. Comparación de la velocidad específica y densidad celular de *Tetraselmis* sp. en Fertilizante y F/2 de Guillard

Según los resultados anteriores, y con un $\alpha=0,05$, utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey, se puede decir que el medio fertilizante (1,832 d⁻¹) presenta una mayor velocidad específica de crecimiento al igual que una mayor productividad (2,5x10⁵ células mL⁻¹ d⁻¹) comparado con el medio de referencia F/2 de

Guillard ($0,885\text{ d}^{-1}$, y $1,9 \times 10^5$ células $\text{mL}^{-1}\text{ d}^{-1}$). Dicha comparación presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Algunos investigadores han explorado el uso de medios económicos derivados de fertilizantes o de residuos agrícolas llegando a la conclusión de que *Tetraselmis* es una microalga resistente que no requiere de vitaminas para su crecimiento, lo cual concuerda con los resultados de este estudio, ya que el uso de fertilizante compuesto solamente por fuentes de nitrógeno (nitrato), fósforo (fosfato) y potasio promovió el crecimiento de la microalga de forma similar a los otros medios comerciales [18].

Concentración de fertilizante

En la Figura 3, se presentan las velocidades específicas de crecimiento, la productividad y la

concentración de biomasa de *Tetraselmis* sp., para las diferentes concentraciones de fertilizante, estudiadas en matraces de erlenmeyer con aireación. Se aprecia que bajo la concentración de fertilizante de $0,4\text{ mL}^{-1}$ se lograron los mejores resultados con una velocidad específica de $0,55\text{ d}^{-1}$ ($\text{td}=1,26$ días), una productividad de $80\text{ mg g}^{-1}\text{ d}^{-1}$ y una concentración final de biomasa de 600 mg L^{-1} . Soto-León y colaboradores (2014), también realizaron cultivos con *Tetraselmis suecica* a diferentes concentraciones de nitrógeno y de manera similar encontraron que la velocidad de crecimiento disminuyó con el aumento de la concentración de nitrógeno, alcanzando velocidades entre $0,9$ y $0,64\text{ d}^{-1}$ y la más alta concentración de biomasa fue de 246 mg L^{-1} [19].

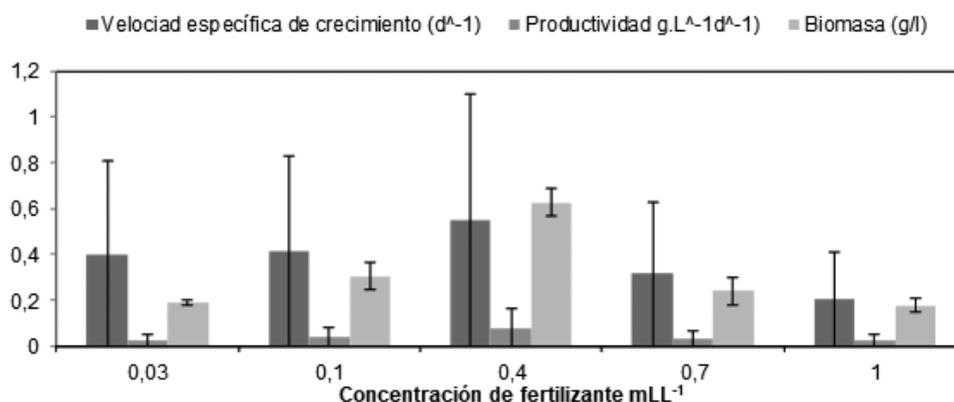


Figura 3. Velocidad específica de crecimiento, productividad y concentración de biomasa de *Tetraselmis* sp. en diferentes concentraciones de fertilizante.

Fotoperiodo

En la Figura 4, se presentan las curvas de crecimiento para *Tetraselmis* sp. evaluada bajo dos condiciones del fotoperiodo, 24:0 y 12:12. *Tetraselmis* sp. crece más aceleradamente y alcanza mayores densidades celulares cuando se le suministra luz de manera continua, comparado con el cultivo en fotoperiodo 12:12 (velocidad específica de crecimiento $0,59 \pm 0,06\text{ d}^{-1}$ y $0,29 \pm 0,00\text{ d}^{-1}$, respectivamente). Este resultado está de acuerdo a lo obtenido por otros autores que afirman que la luz continua es muy importante para el crecimiento de *Tetraselmis* y genera mayores

densidades celulares que los fotoperiodos de luz/oscuridad [15, 16, 20]. Debido probablemente a que es una microalga tropical sometida a largos periodos de luz, sin embargo, es conveniente estudiar otros fotoperiodos intermedios ya que para algunas microalgas es más favorable tener un espacio de oscuridad para un crecimiento balanceado, mientras que la iluminación continua es utilizada para promover la producción de metabolitos. Además, se debe tener en cuenta que la iluminación con luz artificial tiene un costo muy significativo en el cultivo [18].

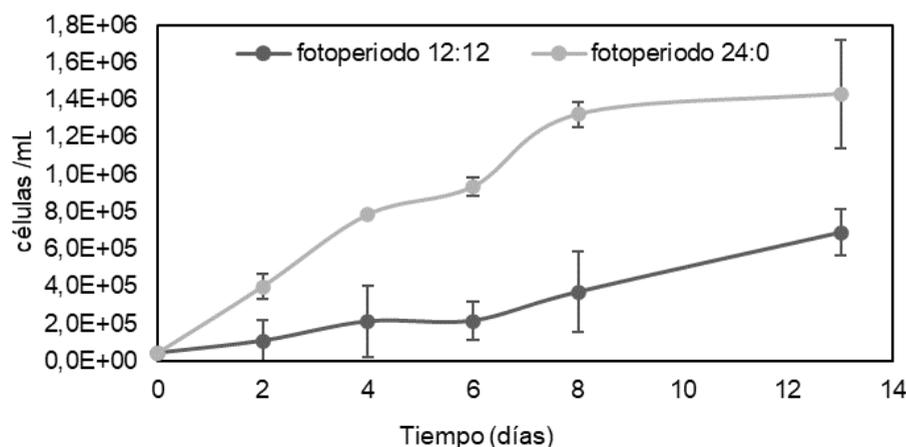


Figura 4. Densidad celular de *Tetraselmis* sp. bajo diferentes fotoperiodos.

Cultivo en fotobiorreactor tipo columna de burbujeo

Una vez obtenidas las condiciones para el crecimiento de *Tetraselmis* sp., en relación con la concentración del fertilizante, y el fotoperiodo, se realizaron los cultivos en el fotobiorreactor (FBR) para determinar los consumos de nutrientes como amonio, nitrato, sulfato, producción de clorofilas y carotenos; además de los cálculos de los diferentes parámetros cinéticos de la microalga.

Consumo de sales

El consumo de las sales de nitrato, amonio y fosfato fue del $11 \pm 1\%$, $85 \pm 1\%$ y $92 \pm 5\%$, respectivamente. Al medio de cultivo a base de fertilizante se cuantificó las concentraciones iniciales nitratos y amonio obteniendo valores de $54,9 \text{ gL}^{-1}$ y $109,66 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente y de manera similar al final del cultivo. De esta forma, se logró un consumo de amonio de 85% , lo cual demuestra una preferencia de la microalga por esta fuente de nitrógeno, debido a la facilidad que tiene el amonio para incorporarse a la síntesis de aminoácidos por transaminación [21]. Basados en la producción de biomasa y los nutrientes consumidos se pudo determinar los rendimientos de biomasa-Nitrógeno en forma de amonio y $8,2 \text{ g Biomasa g}^{-1} \text{ N}$ ($10,5 \text{ g Biomasa g}^{-1}$ amonio). El rendimiento biomasa – Fósforo fue $37,7 \text{ g Biomasa g}^{-1}$ Fósforo. Estos

elevados consumos y altos rendimientos colocan a esta microalga como una fuerte candidata en la remoción de nitrógeno y fósforo en sistemas de tratamiento de aguas residuales [3]. Por otro lado, Blanken y colaboradores (2016), al evaluar los rendimientos Y_x/s respecto a nitrato y amonio en *Chlorella sorokiniana* ($0,54$ y $0,59 \text{ cmol-x/cmol-s}$) y *Chlamydomonas reinhardtii* ($0,58$ y $0,69 \text{ cmol-x/cmol-s}$) encontraron que el rendimiento en amonio era mayor que en nitrato para ambas microalgas [22], dicha característica también se presentó en los cultivos realizados con *Tetraselmis* sp. en el presente estudio (Tabla 2). Otros autores han estudiado la remoción de nutrientes con microalgas del género *Tetraselmis*, Sacristán de Alva y colaboradores obtuvieron remociones de nitrógeno total de más del 95% , y de ortofosfatos de más del 98% [23], *Tetraselmis suecica* removió $79,4\%$ de fósforo total al día 8 y 83% al día 16 alcanzando concentración de biomasa de $0,55 \text{ gL}^{-1}$ [24].

En la Tabla 2, se presenta un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos durante los experimentos realizados en esta investigación y se aprecia como las condiciones hidrodinámicas del FBR mejoran los parámetros cinéticos como la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *Tetraselmis* sp., obtenidos en FBR.

Parámetro	Valor	Unidades
Velocidad específica de crecimiento (u)	0,59	d ⁻¹
Tiempo de duplicación (td)	1,17	d
Velocidad específica de crecimiento (u)	1,071	d ⁻¹
Tiempo de duplicación (td)	0,64	d
Rendimiento (Yx/nitrato)	4,3	g de biomasa/g de nitrato
Rendimiento (Yx/fosfato)	37,7	g de biomasa/g de fosfato
Rendimiento (Yx/amonio)	10,5	g de biomasa/g de amonio

Acumulación de clorofilas y carotenoides

La Figura 5, presenta la acumulación de la clorofila a y b con los carotenos durante el cultivo en el FBR. En general, la concentración de clorofila a es mayor durante todos los días de cultivo, hay una tendencia en el aumento de la concentración de pigmentos de acuerdo con el incremento en la densidad celular. Se encontró una concentración de pigmentos semejante a los valores reportados por otros autores [16], donde se observa como

la clorofila a, clorofila b, aumentan de manera gradual con la densidad celular, situación que también se aprecia con los pigmentos carotenoides. Saldarriaga y colaboradores (2007) y Zhen Li (2012), también encontraron un perfil similar respecto a la producción de clorofilas y carotenoides los cuales se acumularon conforme se producía la biomasa en cultivos microalgales [25, 26].

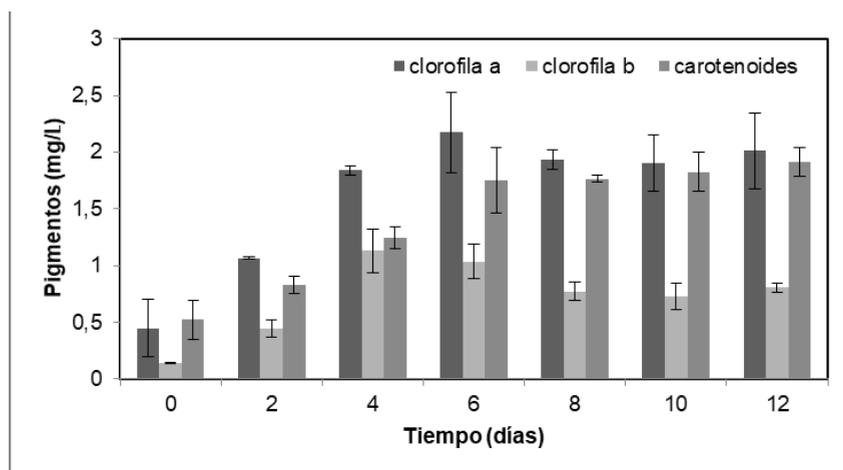


Figura 5. Clorofila y carotenos en Fotobiorreactor tipo columna de burbujeo para *Tetraselmis* sp.

Contenido de proteínas y perfil de aminoácidos

Respecto a la composición de la microalga *Tetraselmis* sp. el contenido de carbohidratos fue del 40±2 % (73 pg/célula), el de proteína del 55±3 % (110pg/célula), los cuales, aunque están dentro de los rangos establecidos para microalgas, superan los resultados obtenidos para *Tetraselmis suecica* donde se reportan 39% de proteína y 8% de carbohidratos [27]. El contenido de proteína disminuye en la fase estacionaria y se relaciona con la síntesis de proteínas de respuesta al estrés, estos resultados coinciden con los encontrados

por otros autores (49,6%) [28]. El contenido de carbohidratos varía según las fases de crecimiento, ya que el proceso de acumulación de carbohidratos es un mecanismo celular de respuesta al estrés, en las fases de adaptación y estacionaria se observan incrementos en el porcentaje de carbohidratos teniendo en cuenta que la microalga se enfrenta a altas concentraciones de nutrientes (fase de adaptación) o a ausencia de nutrientes (fase estacionaria) [28].

Si bien, la composición química de las microalgas está regulada en gran medida por la composición

y condiciones del cultivo, su perfil de aminoácidos en las proteínas determina en gran medida el valor nutricional de las microalgas. Estas pueden sintetizar aminoácidos esenciales que son claves para una adecuada alimentación en acuicultura. De este modo, la Tabla 3 muestra el perfil de aminoácidos de la biomasa de *Tetraselmis* sp., comparada con los resultados de otros investigadores. Abalde y colaboradores [27], presentan un perfil de aminoácidos de *Tetraselmis suecica* con características similares a *Tetraselmis* sp. lograda en esta investigación. Por otro lado, se compara con el perfil de aminoácidos del trigo, ya que este es uno de los sustratos más empleados en acuicultura gracias a sus aportes nutricionales desde el punto de vista proteico [29]. Es así como en la Tabla 3, se presenta un perfil de aminoácidos del trigo proporcionado por Morris [30], donde se aprecia que muchos de los aminoácidos presentes en *Tetraselmis* sp., se pueden comparar con los aportados por este cereal.

Modelo de Gompertz

En la Figura 6, se presenta la cinética de producción de biomasa en FBR tipo columna de burbujeo, y el ajuste al modelo Gompertz. De acuerdo con

los resultados obtenidos se logró un buen ajuste ($r^2=0,9$), y alcanzando una velocidad específica de crecimiento de $1,071 \text{ d}^{-1}$ ($td=0,64 \text{ d}$). La mayor densidad celular encontrada en el presente estudio fue de $2,11$ millones de células ml^{-1} al día 13. Las densidades celulares obtenidas por otros autores para *Tetraselmis* sp. varían mucho según las condiciones de cada estudio van desde $1,5$ millones de células ml^{-1} al día 7 [31] y $1,4$ millones de células ml^{-1} [28], hasta 25 millones de células mL^{-1} [15]. Mohsen Mansouri (2016), también emplearon el modelo de Gompertz en cultivos en airlift para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, logrando también un buen ajuste ($0,969$) con los resultados experimentales [32]. Las posibles razones de las menores densidades pueden tener relación con el tamaño del inóculo, y con que el medio no contiene Fe^{3+} y Mn^{2+} en las concentraciones suficientes, ya que probablemente sólo esté como traza en el fertilizante y/o en las sales del agua de mar artificial que según Okauchi *et al* [31], son indispensables para el crecimiento de *Tetraselmis* sp., por lo tanto se recomienda realizar pruebas adicionando estos nutrientes al medio que demuestren la importancia de estos nutrientes en cultivos que emplean fertilizantes.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos en la biomasa de *Tetraselmis* sp.

Aminoácido	<i>Tetraselmis</i> sp. *este estudio (g/16 g N)	Abalde <i>et al.</i> , 1995 (g/16gN)	Morris <i>et al.</i> , 1999 (g/16gN)
Glutamato	13,8	9,9	27,7
Serina	4,5	4,9	4,8
Histidina	1,9	2,5	2,1
Glicina	4,9	5,8	3,8
Treonina	4,2	5,3	2,9
Arginina	8,6	7,6	4,3
Alanina	6,8	6,8	3,4
Tirosina	3,0	3,5	3,2
Cisteína	1,0	0,6	2,1
Valina	0,3	5,6	4,3
Metionina	2,2	1,4	1,6
Fenilalanina	3,7	5,9	4,6
Isoleucina	2,2	4,2	3,8
Leucina	5,7	9,2	6,4
Lisina	0,2	9,8	2,7
Prolina	0,3	6	10,1
Aspartato	16,0	7,5	5,0

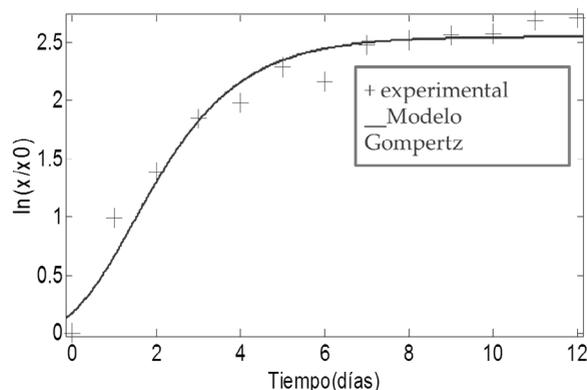


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Tetraselmis* sp. en columna de burbujeo y ajuste del modelo cinético de Gompertz.

Conclusiones

El medio de cultivo a base de fertilizante líquido genera buenas velocidades de crecimiento celular y productividades y además tienen una mayor facilidad de preparación que los otros medios estudiados. La iluminación continua es una variable muy importante para el crecimiento de la microalga *Tetraselmis* sp., Los consumos de sales de amonio y fosfatos son altos, presentando a esta microalga como candidata en el tratamiento de aguas residuales. Las condiciones hidrodinámicas de FBR hacen posible que la velocidad específica de crecimiento sea mayor al compararlas con los cultivos en matraces de Erlenmeyer. El contenido de proteína de esta microalga cultivada en fertilizante es mayor al 50% y su perfil de aminoácidos es adecuado para su implementación o uso como alimento vivo en acuicultura. El modelo de Gompertz presenta un ajuste con los resultados experimentales muy alto para representar la producción de biomasa en el FBR. Finalmente, se recomienda estudiar otros factores que permitan mejorar las densidades celulares de *Tetraselmis* sp. tales como inóculos más altos y adición de sales de hierro y magnesio cuando se emplean fertilizantes como medio de cultivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Acuario del Parque Explora, al Programa Joven investigador de Colciencias y a la Universidad de Antioquia por el apoyo económico para el desarrollo del proyecto (PI07-1-05).

Referencias bibliográficas

- [1] Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. 2003;20(4-6):459-66.
- [2] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101(2):87-96.
- [3] Michels MHA, Vaskoska M, Vermuë MH, Wijffels RH. Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm. *Water Research*. 2014;65(0):290-6.
- [4] Torrentera-Blanco L, Tacon AGJ. La producción de alimento vivo y su importancia en la acuicultura. 1989. Consultado Marzo 18 de 2008 en: <http://www.fao.org/documents/>; 2008.
- [5] Arredondo B, Voltolina D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal. *nomoeste Cldd*, editor. México; 2007.
- [6] Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol*. 1962;8:229-239.
- [7] Acosta A. Estudio de la intensidad lumínica y fuentes de carbono en el cultivo de *Haematococcus pluvialis* a nivel de fotobiorreactor de laboratorio (tesis de maestría). Medellín: Universidad de Antioquia; 2007.
- [8] Collos Y, Mornet F, Sciandra A, Waser N, Larson A, Harrison PJ. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures.

- Journal of Applied Phycology. 1999;11.
- [9] Saudagar PS, S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Bioresource Technology. 2007;98:7.
- [10] Çelekli A, Yavuzatmaca M, Bozkurt H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. Bioresource Technology. 2009;100(14):3625-9.
- [11] Doran P. Bioprocess Engineering Principles. Press A, editor. London; 1995.
- [12] Sarkar PB, Ghosh, NN. Studies on nessler's reagent part I. Anal. Chim. Acta. 1995;13:95-199.
- [13] Quevedo CM, S; Acosta A. *Scenedesmus* sp. growth in different culture mediums for microalgal protein production. VITAE. 2008;15(1):7.
- [14] Metaxatos A, Panagiotopoulos C, Ignatiades L. Monosaccharide and aminoacid composition of mucilage material produced from a mixture of four phytoplanktonic taxa. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2003;294(2):203-17.
- [15] Sen B, Kocer MAT, Alp MT. Studies on Growth of Marine Microalgae in Batch Cultures: IV. *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyta). Asian Journal of Plant Sciences. 2005;4(6):645-7.
- [16] Ghezalbash F, Farboodnia T, Heidari R, Agh N. Effects of Different Salinities and Luminance on Growth Rate of the Green Microalgae *Tetraselmis chui*. Research Journal of Biological Sciences. 2008;3(3):4.
- [17] Singh SP, Sing P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. Renew Sustain Energy Rev. 2015;50:13.
- [18] Vanthoor-Koopmans M, Cordoba-Matson M, Arredondo-Vega B, Lozano-Ramírez C, Garcia-Trejo J, Rodriguez-Palacio M. Microalgae and Cyanobacteria Production for Feed and Food Supplements. In: Guevara-Gonzalez R, Torres-Pacheco I, editors. Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI: Springer International Publishing; 2014. p. 253-75.
- [19] Soto-Leon S, Zazueta-Patrón E, Piña-Valdez P, Nieves-Soto C, Reyes Moreno C, Contreras-Andrade I. Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2014;13(3):253-275
- [20] Meseck SL, Alix JH, Wikfors GH. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). Aquaculture. 2005;246(1-4):393-404.
- [21] Contreras F. Manual de Técnicas hidrobiológicas. Trillas, editor. México; 1994.
- [22] Blanken W, Alix JH, Wikfors GH. Predicting microalgae growth. Algal Research Elsevier BV. 2016;14:10.
- [23] Sacristán de Alva M, Luna Pabello M, Orta Ledesma MT, Cruz Gómez MJ. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. Algal Res. 2018;34(July):97-103
- [24] Patel A, Barrington S, Lefsrud M. Microalgae for phosphorus removal and biomass production: A six species screen for dual-purpose organisms. GCB Bioenergy. 2012; 4(5):485-495
- [25] Saldarriaga N, Acosta Cárdenas A, Atehortua L. Remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales de tratamiento primario empleando la microalga *Dunaliella salina*. III Simposio sobre Biofábricas La Biotecnología como Herramienta para el Desarrollo y el Bienestar. 2007.
- [26] Li Z. A novel potential source of b-carotene: Eustigmatoscf.polyphem(Eustigmatophyceae) and pilot b-carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. J Chem Inf Model. 2012;117:6.
- [27] Abalde J, Cid A, Hidalgo JP, Torres E, Herrero C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Coruña: Universidade da Coruña; 1995.
- [28] Peña MRdl, Villegas, C. T. Cell growth, effect of filtrate and nutritive value of the tropical Prasinophyte *Tetraselmis tetrahele* (Butcher) at different phases of culture. Aquaculture Research. 2005;36:1500-8.
- [29] Gómez Restrepo HJ. Hacia la sostenibilidad y competitividad de la acuicultura Colombiana. Acuanal y Fedecua. Programa de Transformación Productiva, PTP Colombia; 2014.
- [30] Morris H, Quintana M, Almarales A, Hernández L. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 1999;13:5.

- [31] Okauchi M, Kawamura K. Optimum medium for large-scale culture of *Tetraselmis tetrathele*. *Hydrobiologia*. 1997;358(1):217-22.
- [32] Mansouri M. Predictive modeling of biomass production by *Chlorella vulgaris* in a drafttube airlift photobioreactor. *Advances in Environmental Technology*. 2016;3:7.