

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“PRODUCCIÓN DE UN ENSILADO DE RESIDUOS DE LISA
(*Mugil cephalus*) PARA EL CULTIVO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica (*Chlorophyta*)”**

Presentada por:

Leticia Fernández Futuri

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PRODUCCIÓN DE UN ENSILADO DE RESIDUOS DE LISA
(*Mugil cephalus*) PARA EL CULTIVO DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica (*Chlorophyta*)”**

Presentada por:

Leticia Fernández Futuri

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Patricia Gil Kodaka
PRESIDENTE

Ing. Lawrence Quipuzco Ushñahua
MIEMBRO

Blgo. Roberto Ramos Chaupin
MIEMBRO

Blgo. Juan Juscamaita Morales
ASESOR

Mg. Sc. Jessie Marina Vargas Cárdenas
CO - ASESORA

DEDICATORIA

A mis amados padres, Mario y Matilde, por ser mi ejemplo de superación, fuerza y razón de ser. A mi hermana Ana, de quien he aprendido a levantarme y a seguir creciendo cada día.

AGRADECIMIENTOS

La riqueza de la vida se mide en la cantidad de amigos que se tiene. En este sentido quiero dar mis sinceros agradecimientos a todos quienes colaboraron con la realización de este trabajo de investigación, especialmente a Edwin Ccoyllo Terrones, Renzo Silva Cano, Nidia Huaman Marin, Jimmy Cañari Cancho y Guido Gerónimo Maldonado.

Al Blgo. Juan Juscamaita, asesor, por su tiempo, dedicación, motivación, consejos para desarrollar el presente trabajo de investigación, y acogerme en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Biorremediación perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

A la Mg. Sc. Jessie Vargas por sus consejos, paciencia, y aceptar ser mi co-asesora en el presente trabajo de investigación y aceptarme en el Laboratorio de Acuicultura, en el Área de Alimento vivo perteneciente a la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

A la Dra. Gil Kodaka, Blgo. Ramos Chaupín e Ing. Lawrence Quipuzco, por sus consejos, sugerencias y gran amistad.

A mis amigos Giovanni Rosales Cabello, Yasmin Castillo Garcia y Ricardo Herrera Cárdenas, gracias por su apoyo constante, amistad y consejos.

A mis padres y hermana, estoy eternamente agradecida por todo el apoyo y el amor que siempre me han brindado.

Para todos ellos, mi más sincera gratitud.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	LISA.....	3
2.1.1	Clasificación taxonómica	3
2.1.2	Características generales.....	3
2.1.3	Distribución	4
2.1.4	Composición físico química	5
2.1.5	Desembarque	6
2.2	MARCO LEGAL.....	8
2.3	ENSILADO DE PESCADO	8
2.3.1	Ensilado químico	9
2.3.2	Ensilado biológico	10
2.4	FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA	13
2.4.1	Bacterias ácido lácticas.....	14
2.4.2	Consortio microbiano ácido láctico (B-Lac).....	18
2.5	MELAZA DE CAÑA	19
2.5.1	Composición.....	20
2.5.2	Aplicaciones	21
2.6	ASPECTOS GENERALES DE LAS MICROALGAS	22
2.6.1	Fases de crecimiento microalgal	23
2.7	MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i>	25
2.7.1	Clasificación Taxonómica	25
2.7.2	Aspectos biológicos	25
2.7.3	Actividad antimicrobiana	26
2.8	PARÁMETROS DE CULTIVO.....	27

2.8.1	Luz.....	27
2.8.2	Temperatura.....	28
2.8.3	pH.....	29
2.8.4	Salinidad.....	29
2.8.5	Aireación.....	30
2.8.6	Nutrientes.....	30
2.9	MEDIOS DE CULTIVO.....	34
2.9.1	Enriquecimiento.....	34
2.10	TIPOS DE CULTIVO.....	36
2.10.1	Cultivo en lote.....	36
2.10.2	Cultivo continuo.....	36
2.10.3	Cultivo inmovilizado.....	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	38
3.2	MATERIALES Y EQUIPOS.....	38
3.2.1	Materia prima e insumos.....	38
3.2.2	Reactivos químicos.....	38
3.2.3	Materiales.....	39
3.2.4	Equipos.....	40
3.3	MÉTODOS.....	41
3.3.1	Medición del pH.....	41
3.3.2	Medición del porcentaje de acidez láctica.....	41
3.3.3	Tasa específica de crecimiento poblacional (μ).....	41
3.3.4	Análisis físico químico.....	42
3.3.5	Análisis químico proximal.....	42
3.3.6	Análisis microbiológico.....	43
3.4	PROCEDIMIENTO.....	43

3.4.1	Primera etapa	44
3.4.2	Segunda etapa.....	47
3.4.3	Tercera etapa.....	51
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1	MATERIA PRIMA.....	56
4.2	PRIMERA ETAPA.....	58
4.2.1	Determinación de las proporciones de melaza y B-Lac	58
4.2.2	Selección del mejor tratamiento	64
4.3	SEGUNDA ETAPA	66
4.3.1	Producción del ensilado a escala piloto.....	66
4.3.2	Caracterización del ensilado líquido de residuos de lisa	69
4.4	TERCERA ETAPA	78
4.4.1	Evaluación del ensilado como fertilizante orgánico para el cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	78
V.	CONCLUSIONES	86
VI.	RECOMENDACIONES	87
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
VIII.	ANEXOS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición física de la lisa.....	5
Tabla 2: Composición química y nutricional de la lisa	6
Tabla 3: Bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas y la configuración	15
Tabla 4: Perfil microbiológico del B-Lac.....	18
Tabla 5: Composición química de la melaza de caña de azúcar	21
Tabla 6: Tratamientos utilizados para determinar los porcentajes de melaza y B-Lac	45
Tabla 7: Composición de los medios de cultivo para <i>Tetraselmis suecica</i>	53
Tabla 8: Resultados del análisis microbiológico de los residuos del fileteado de lisa	56
Tabla 9: Composición físico químico (base seca) de los residuos de lisa.....	57
Tabla 10: Evaluación física de la calidad de los ensilados.....	65
Tabla 11: Evaluación sensorial de la calidad de los mejores tratamientos	65
Tabla 12: Composición del ensilado producido a escala piloto	66
Tabla 13: Medición de los componentes del ensilado de lisa.....	67
Tabla 14: Composición físico-químico del ensilado líquido de residuos de lisa	70
Tabla 15: Análisis físico químico de fertilizantes elaborados a partir de residuos de pescado	72
Tabla 16: Límite máximo de metales pesados.....	73
Tabla 17: Composición proximal (base húmeda) del ensilado de residuos de lisa	75
Tabla 18: Análisis microbiológico del ensilado líquido de lisa	76
Tabla 19: Límite máximo de microorganismos en productos fertilizantes de origen orgánico	77
Tabla 20: Características de los tratamientos utilizando el ensilado de residuos de lisa.....	79
Tabla 21: Valores de la densidad celular obtenidos durante los días de cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> (10^5 células/mL).....	80
Tabla 22: Valores promedio de los parámetros de crecimiento de <i>Tetraselmis suecica</i>	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Colores del pez lisa	4
Figura 2: Ingreso de la lisa al mercado mayorista pesquero de Ventanilla- Callao, Perú	7
Figura 3: Ingreso de la lisa al mercado mayorista pesquero de VMT, Perú.....	7
Figura 4: Proceso ensilado químico de pescado	10
Figura 5: Proceso ensilado biológico de pescado	11
Figura 6: Proceso de obtención de la melaza de caña de azúcar	20
Figura 7: Fases de crecimiento de un cultivo microalgal.	24
Figura 8: Flujograma experimental de la elaboración del ensilado de pescado para la primera etapa	46
Figura 9: Flujograma experimental de la producción del ensilado de residuos de lisa para la segunda etapa.....	48
Figura 10: Diagrama experimental de la primera y segunda etapa	50
Figura 11: Diagrama experimental de la tercera etapa	54
Figura 12: Niveles de pH de los diferentes tratamientos.....	59
Figura 13: Comparación múltiple de los valores de pH.	60
Figura 14: Porcentajes de ácido láctico de los diferentes tratamientos	62
Figura 15: Comparación múltiple para el porcentaje de ácido láctico	63
Figura 16: Comparación de los niveles de pH y porcentaje de acidez láctica de los ensilados elaborados a escala laboratorio y piloto.....	68
Figura 17: Densidad celular (10^5 células/mL) durante el cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> ..	81
Figura 18: Comportamiento de la tasa de crecimiento μ (días^{-1})	82
Figura 19: Curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos y su evolución del pH durante los días de cultivo	84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Niveles de pH	104
Anexo 2: Prueba estadística para el pH.....	105
Anexo 3: Porcentajes de ácido láctico (expresado en %).....	107
Anexo 4: Prueba estadística de porcentaje de acidez láctica	108
Anexo 5: Valores de pH y porcentaje de acidez láctica del ensilado.....	110
producido a escala piloto.....	110
Anexo 6: Densidad celular obtenida durante los días de cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> (10^5 células/mL)	110
Anexo 7: Valores promedio de los pH obtenidos durante los días de cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	111
Anexo 8: Análisis de la densidad en el cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	111
Anexo 9: Análisis de la tasa de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	113
Anexo 10: Composición química de los tratamientos utilizados en el cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	115
Anexo 11: Composición del Medio Yashima	115
Anexo 12: Informes de Laboratorio	116
Anexo 13: Registro fotográfico.....	122

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue producir un ensilado y determinar los cambios en la composición química y microbiológica de los residuos del fileteado de lisa (*Mugil cephalus*), fermentados con un consorcio microbiano ácido láctico (B-Lac) y melaza de caña de azúcar como fuente de carbono. Los desechos se mezclaron con melaza y el B-Lac en diferentes proporciones. A los 5 días de fermentación, se observó que la utilización de 15 por ciento (p/p) de melaza y 5 por ciento (p/p) de B-Lac fueron suficientes para producir la acidez necesaria para obtener el ensilado biológico de residuos de lisa a 40 °C, con un pH final de 4.28 ± 0.01 y acidez láctica de 4.02 ± 0.03 por ciento los cuales se mantuvieron estables hasta los 30 días. El ensilado producido presentó características físicas y químicas aceptables. El contenido de nitrógeno, fósforo y potasio fue de 18592 mg/L, 1680.08 mg/L, 8800 mg/L respectivamente. Mientras el contenido total de proteína y grasa fue de 13 g/100 g y 12 g/100 g respectivamente. Los coliformes totales, *E. coli*, mohos, levaduras y *Salmonella* sp no estuvieron presentes porque son inhibidos por el proceso de ensilaje y este tienen características adecuadas para para su utilización como medio de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*, cuando se aplica en diluciones de 1/1000 hasta 1/2000 con agua de mar al 20 ‰.

Palabras clave: fermentación ácido láctico, ensilado biológico, *Mugil cephalus*, microalga, *Tetraselmis suecica*.

SUMMARY

The purpose of this study was to produce silage and determine changes in the chemical and microbiological lisa filleting residue (*Mugil cephalus*), fermented with a lactic acid microbial consortium (B-Lac) and sugar cane molasses as carbon source. The waste is mixed with sugar cane molasses and B-Lac in different proportions. At the end of five days of fermentation, it was observed that the use of 15 percent (w/w) of molasses and 5 percent (w/w) of B-Lac were sufficient to produce the acidity necessary to obtain the biological silage of lisa waste at 40 °C, with a final pH of 4.28 ± 0.01 and lactic acidity of 4.02 ± 0.03 percent which remained stable until the 40 days. The silage produced had acceptable physical and chemical characteristics. Nitrogen, phosphorus and potassium content was 18592 mg/L, 1680.08 mg/L, 8800 mg/L respectively. While total protein and fats content was 13g /100 g and 12 g/100 g respectively. Total coliforms, molds, yeasts and *Salmonella* sp were not present because they are inhibited by the ensiling process and that have characteristics suitable for use as a culture medium for the microalga *Tetraselmis suecica*, when applied in dilutions of 1/1000 to 1/2000 with seawater at 20 ‰.

Keywords: lactic acid fermentation, biological silage, *Mugil cephalus*, microalgae, *Tetraselmis suecica*.

I. INTRODUCCIÓN

En el 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 más importantes del país. La lisa (*Mugil cephalus*) es considerado uno de los principales recursos hidrobiológicos que sustentan la pesquería artesanal, sólo en el 2016 se desembarcó un total de 15 758 TM de lisa para consumo directo (PRODUCE 2017).

Los residuos de la industria pesquera (vísceras, cabezas, piel, huesos, colas, etc.) se cuantifican alrededor del 50 al 60 por ciento de la materia prima (Berenz 1997). El tipo de residuos generados por esta actividad depende básicamente del tipo de industria, materia prima procesada, línea de proceso productivo y operación del proceso productivo (Martínez 2003) La mayoría de estos desechos son vertidos indiscriminadamente al medio ambiente resultando finalmente en contaminantes, esto ocasiona un aumento de la contaminación ambiental y el desperdicio de proteína de alta calidad.

Dentro de los aprovechamientos más sustentables de estos desechos se encuentra la producción de ensilados de pescado, el cual mediante un proceso de fermentación ácido-láctica, permite obtener un producto de buena calidad de alto valor proteico, libre de patógenos, de fácil elaboración y bajo costo; con características idóneas para ser empleado como componente de raciones alimenticias para animales (Valenzuela *et al.* 2015, Sánchez y Ochoa 2016) o como fertilizante orgánico en acuicultura (González y Marín 2005).

La microalga *Tetraselmis suecica* adquiere gran importancia en la actualidad por ser una de las especies más utilizadas en la acuicultura de moluscos y crustáceos, y su potencialidad como fuente de biodiesel, la cual posee en base seca 52 por ciento de proteína y entre 15 a 23 por ciento de lípidos (Hirata *et al.* 2001) y en los últimos años se ha despertado un gran interés por su producción a gran escala.

La producción de microalgas de buena calidad a gran escala para alimentar diferentes organismos de importancia en la acuicultura, resulta dificultosa debido al costo de producción. 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, como el uso de diversas harinas (de pescado, soya, lombriz de tierra, girasol), gallinaza, melaza de caña, extractos de macroalgas, EM-Bokashi y la sanguaza de pescado (Chinchayan 1996; Rodríguez *et al.* 2007; Silva *et al.* 2011).

Dada la importancia de disminuir los costos en la producción de microalgas y al mismo tiempo, mitigar el impacto ambiental de los residuos emitidos por la industria pesquera mediante la producción de un ensilado biológico de residuos de lisa, se considera importante evaluar el ensilado como medio de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* y determinar la dilución óptima del mismo.

Por lo anterior, se tuvieron los siguientes objetivos de investigación:

Objetivo general

Producción de un ensilado de residuos de lisa (*Mugil cephalus*) para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* (*Chlorophyta*).

Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento de los parámetros pH y porcentaje de acidez láctica de la mezcla de diferentes proporciones de inóculo (B-Lac) y de fuente de carbono (melaza) que produzcan una fermentación adecuada de los residuos de lisa.
- Analizar los parámetros físico-químicos del ensilado de residuos de lisa tales como macronutrientes y micronutrientes.
- Evaluar si el ensilado de residuos de lisa contiene microorganismos patógenos (coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, mohos y levaduras).
- Evaluación del ensilado de residuos de lisa como fertilizante orgánico para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* a escala de laboratorio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LISA

2.1.1 Clasificación taxonómica

Según Webb *et al.* (1981) y Chirichigno (1980); la posición taxonómica de la lisa es la siguiente:

Reino:	Animal
Phylum:	Chordata
Sub-phylum:	Vertebrata
Super clase:	Pisces
Clase:	Osteichthyes
Orden:	Persiformes
Suborden:	Mugiloidei
Familia:	Mugilidae
Género:	Mugil
Especie:	<i>Mugil cephalus</i> L.

2.1.2 Características generales

Mugil cephalus “lisa” es uno de las especies con mayor presencia en los mares a nivel mundial, se caracteriza por ser una especie costera que habita en fondos arenosos, arenofangosos, ríos, lagunas y estuarios (Arrieta *et al.* 2010). Posee eficaces reguladores de la concentración salina interna, lo que les permite adentrarse y colonizar aguas con muy diverso contenido en sales; desde las hipersaladas (mayor concentración que el medio marino) hasta las dulces; aunque manifiesta una marcada preferencia por las salobres (Solano 2014). Forma cardúmenes y nada siempre a poca profundidad, por lo que es presa fácil de la pesca. Presenta migraciones, remontando los ríos y retirándose hacia el mar a una distancia variable del litoral para desovar. Asimismo presenta gran adaptabilidad para vivir y alimentarse en

medios turbios y salobres, siendo un excelente filtrador de plancton y materiales orgánicos, considerándose entre las especies aptas para cultivos acuícolas (Gonzales 2001). Alcanza longitudes de 80 cm y puede llegar a pesar 8 kg. Aunque en promedio su longitud oscila entre 20 y 60 cm de largo. Tiene una cabeza pequeña redondeada, pero ancha, lo cual da origen a su nombre (*cephalus*). Su boca es pequeña con labios elásticos (Ramírez *et al.* 2006).

Pertenece a la familia Mugilidae que incluye a unas 100 especies de apariencia similar, con cuerpo en forma de torpedo y una poderosa aleta caudal. El cuerpo está cubierto con escamas grandes y tiene un color plateado. Generalmente su color es más oscuro en la parte superior, con tonalidades verde-oliva, grisáceas (plateadas) o cafés y de color blanco o gris claro en la parte inferior, con rayas longitudinales generalmente bastante apreciables. Sus aletas son bastante pequeñas en comparación al tamaño del cuerpo, no posee una boca ni grande ni pronunciada. Los dientes son muy pequeños y desprovistos de filamentos (Ramírez *et al.* 2006). En la Figura 1 se muestra los colores del pez lisa.

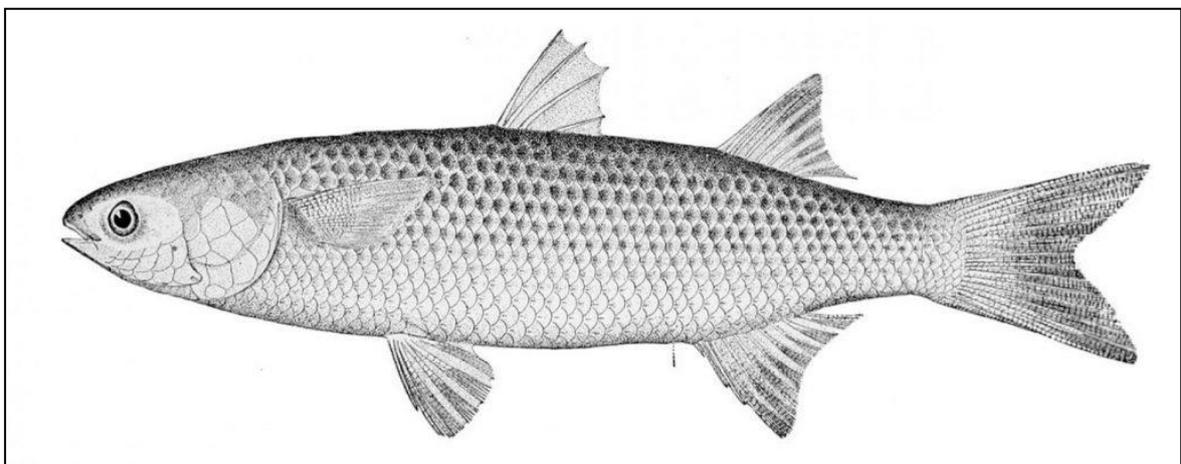


Figura 1: Colores del pez lisa

FUENTE: FAO (2016)

2.1.3 Distribución

La lisa es una especie cosmopolita en zonas tropicales y subtropicales, tiene un amplio rango de distribución latitudinal (aproximadamente 42°N a 42°S). Esta especie se distribuye en las aguas costeras de la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales; en el Pacífico Oriental, California Central y la Bahía de San Francisco (EE. UU), hasta Valdivia e Isla

Galápagos (Chile) y está ausente en las Bahamas y el Caribe (FAO 2016). También se le encuentra presente en las aguas costeras de los Océanos Atlántico e Índico (Cordero *et al.* 2005). En el Perú, las principales zonas de extracción son Cabo Blanco, Parachique, Chimbote, Callao y Pucusana (IMARPE 2017).

2.1.4 Composición físico química

La lisa al igual que la mayoría de las especies de pescado, contiene un elevado contenido de proteínas, el cuál puede variar de 15 a 20 por ciento, es considerada una especie semigrasa (Ramírez *et al.* 2006).

Durante las estaciones de invierno-primavera presenta un menor contenido de proteína y lípidos que durante la época de verano- otoño, estos cambios están asociados con la época de desove (Ramírez *et al.* 2006). En las Tablas 1 y 2 se reporta los valores promedio de la composición física y química de la lisa.

Tabla 1: Composición física de la lisa

Constituyentes	Promedio (%)
Cabeza	16.8
Vísceras	11.3
Espinas	9.0
Piel	5.6
Aletas	3.1
Filetes	51.4
Pérdidas	2.8

FUENTE: IMARPE y ITP (1996).

Tabla 2: Composición química y nutricional de la lisa

	Constituyentes		Promedio (%)
Análisis químico proximal	Humedad		74.6
	Grasa		3.3
	Proteína		20.8
	Sales minerales		1.2
	Calorías (100 g)		149
Componentes minerales	Macroelementos	Sodio (mg/100 g)	118.9
		Potasio (mg/100 g)	421.7
		Calcio (mg/100 g)	6.2
		Magnesio (mg/100 g)	36.7
	Microelementos	Fierro (ppm)	21.2
		Cobre (ppm)	1.1
		Cadmio (ppm)	0.2
		Plomo (ppm)	0.2

FUENTE: IMARPE y ITP (1996).

2.1.5 Desembarque

En la Figura 2 se aprecia el desembarque del pescado lisa en el mercado mayorista de Ventanilla del periodo comprendido 2006-2016. En el año 2016 se realizó la mayor descarga, 4 152 (TM) y la menor cantidad fue en el 2006, de 948 (TM); la mayor expansión ocurrió en 2007, al darse un crecimiento de 202.85 por ciento respecto al año anterior; la mayor reducción fue en el 2010, al contraerse en -35 por ciento y entre cada periodo, tuvo un crecimiento de 15.92 por ciento.

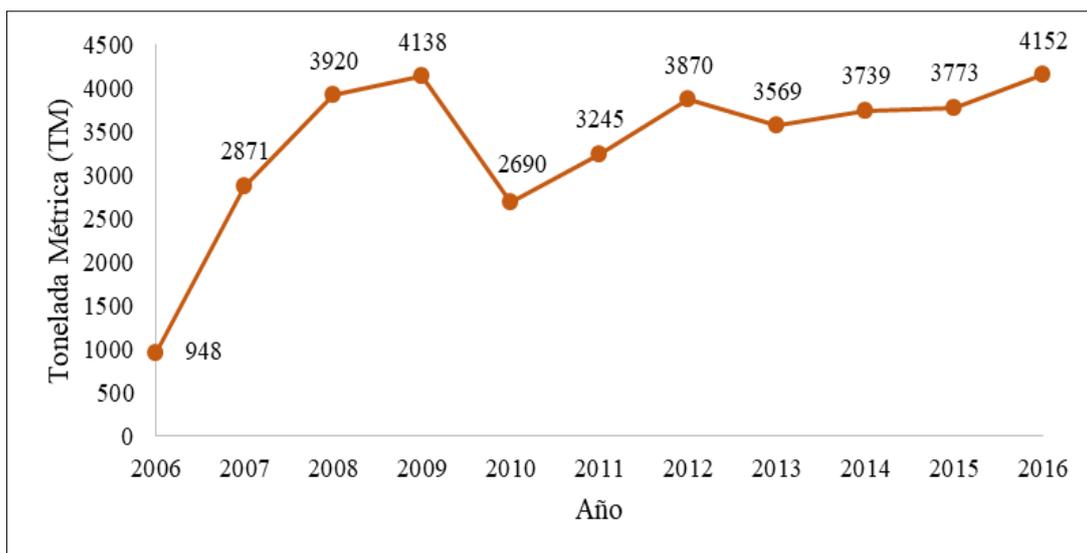


Figura 2: Ingreso de la lisa al mercado mayorista pesquero de Ventanilla- Callao, Perú

FUENTE: PRODUCE (2017).

En la Figura 3 se muestra el ingreso de lisa al mercado mayorista de Villa María del Triunfo. En el 2016 tuvo la mayor recepción, con 2 152 (TM); mientras en el otro extremo, con la menor recepción fue el 2006, con 586 (TM). La mayor expansión fue en el 2008, con 82.33 por ciento mayor respecto al año anterior, la mayor reducción en el 2009, de -33 por ciento; en todo el periodo, entre cada año tuvo un crecimiento de 13.89 por ciento (PRODUCE 2017).

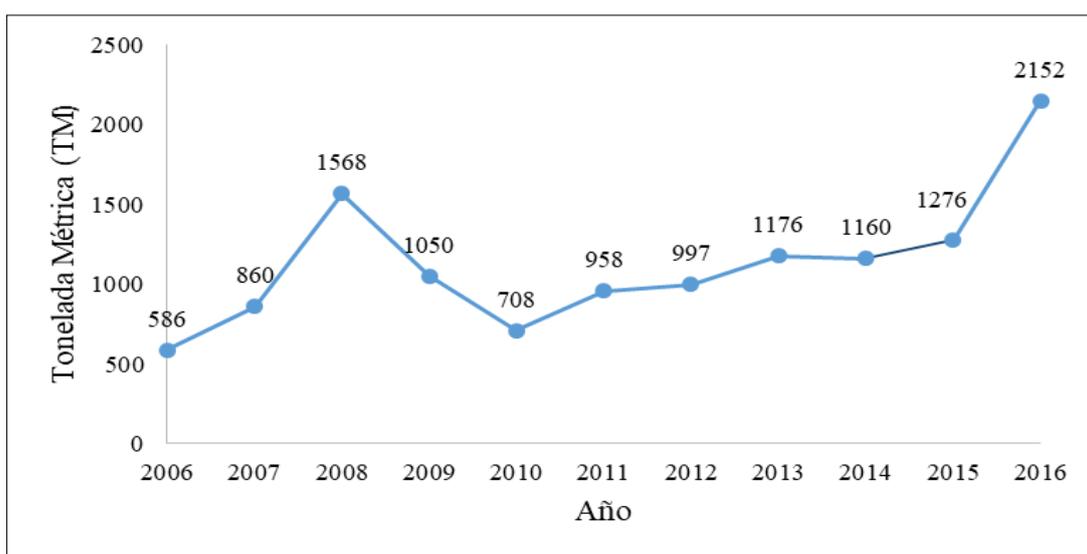


Figura 3: Ingreso de la lisa al mercado mayorista pesquero de VMT, Perú.

FUENTE: PRODUCE (2017).

2.2 MARCO LEGAL

La gestión integral de los residuos sólidos en el país tiene como primera finalidad la prevención o minimización de la generación de residuos sólidos en origen, frente a cualquier otra alternativa. En segundo lugar, respecto de los residuos generados, se prefiere la recuperación y la valorización material y energética de los residuos, entre las cuales se cuenta la reutilización, reciclaje, compostaje, co-procesamiento, entre otras alternativas siempre que se garantice la protección de la salud y del medio ambiente.

La Ley de gestión integral de residuos sólidos, aprobado por el Decreto Legislativo N° 1278, establece derechos, obligaciones, atribuciones y responsabilidades de la sociedad en su conjunto, con la finalidad de propender hacia la maximización constante de la eficiencia en el uso de los materiales y asegurar una gestión y manejo de los residuos sólidos económica, sanitaria y ambientalmente adecuada, con sujeción a las obligaciones, principios y lineamientos de este Decreto Legislativo.

El Decreto Supremo N° 017-2011-PRODUCE, que modifica el Reglamento del procesamiento de descartes y residuos de recursos hidrobiológicos, en su Art 1°, establece que los descartes y residuos generados por la actividad de consumo humano directo deberán ser aprovechados en plantas autorizadas de harina residual de recursos hidrobiológicos, de reaprovechamiento de descartes y residuos de recursos hidrobiológicos, de ensilado, ictiocompost y otros procesos, que permitan la utilización integral y racional del recurso hidrobiológico. En el Art 2°, define que los recursos hidrobiológicos están constituidos por mermas y pérdidas generadas durante los procesos pesqueros de las actividades de procesamiento para consumo humano directo, así como los generados durante las tareas previas realizadas en los desembarcaderos pesqueros artesanales.

2.3 ENSILADO DE PESCADO

Es el producto obtenido a partir de la mezcla de los residuos del pescado (vísceras, cabezas, otros) por métodos biológicos con bacterias lácticas y por métodos químicos con ácidos orgánicos (propiónico, fórmico, y cítrico) e inorgánicos (sulfúrico, clorhídrico y fosfórico), y puede ser utilizado como componente de raciones alimenticias para animales (PRODUCE 2011).

La elaboración del ensilado se basa en someter desechos de pescado a fermentación bacteriana, hidrólisis ácida, o enzimática, generando un producto semi-líquido o pastoso sanitariamente aceptable (Toledo y Llanes 2006). El ensilaje de pescado es un excelente producto proteico de alto valor biológico para la alimentación animal o como medio de enriquecimiento para diferentes cultivos (González y Marín 2005; Llanes *et al.* 2006; Sánchez *et al.* 2008; Valenzuela *et al.* 2015).

Durante el proceso de elaboración de un ensilado de pescado es muy importante la presencia de sustancias ácidas (medio ácido), pues son fundamentales en el mantenimiento de las buenas condiciones tanto físico-químicas como microbiológicas del producto (Bello *et al.* 1993). Existen dos métodos para la elaboración de ensilado: el ensilado químico es cuando se adicionan ácidos orgánicos o inorgánicos a los residuos molidos de pescado, lo cual disminuye el pH y previene así, el deterioro. El segundo es el ensilado biológico, el cual se puede subdividir en microbiológico (uso de cultivos microbianos) y enzimático (uso de enzimas proteolíticas) o en una combinación de ambos (cultivos y enzimas) que junto con una fuente de carbohidratos producen una excelente licuefacción o proteólisis del pescado (González y Marín 2005).

2.3.1 Ensilado químico

El ensilado químico es elaborado por la adición de ácidos minerales y/o orgánicos al pescado. La materia prima se tritura, se le adiciona el o los ácidos y se mezclan completamente, para que las enzimas presentes en el mismo puedan digerirlo en las condiciones favorables que el medio ácido provee (Martínez 2003). Se han empleados solos el ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico o combinados, como mezclas de acético, fórmico y fosfórico; fórmico y sulfúrico o propiónico y sulfúrico. Se prefiere la utilización de ácido fórmico ya que asegura la conservación sin descenso excesivo en el pH, lo que a su vez, evita la etapa de neutralización del producto antes de su empleo en la alimentación animal (Parín y Zugarramurdi 1997). En la Figura 4 se muestra el proceso de ensilado químico de pescado.

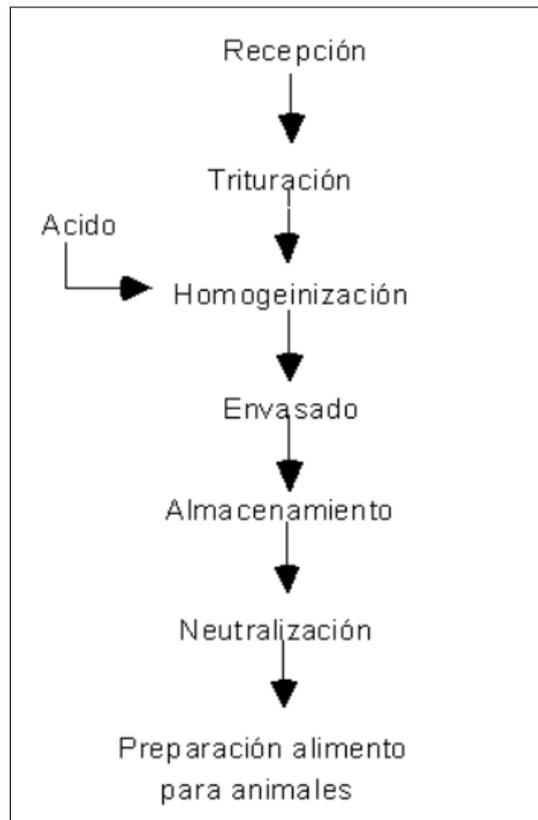


Figura 4: Proceso ensilado químico de pescado
 FUENTE: FAO (2006).

Cordova y Bello (1990) experimentaron con la fauna acompañante del camarón en la obtención de ensilado químico, utilizando ácido sulfúrico y fórmico al 3.5 por ciento; el producto obtenido posteriormente a la deshidratación presentó niveles de proteínas (16,7 por ciento) comparables a la harina de pescado. Posteriormente realizaron un ensayo con pollos en crecimiento; los resultados del ensayo y del análisis proximal, indicaron la factibilidad de utilizar el ensilado en sustitución de harina de pescado tradicional. Rodríguez *et al.* (1990) en un ensilado químico con la misma materia prima, obtuvieron un producto estable y de buena calidad, que al ser suministrado en pollos, produjo un incremento corporal satisfactorio y sin alteraciones al ser evaluada sensorialmente la carne.

2.3.2 Ensilado biológico

El ensilado microbiano o biológico de pescado se basa en la acidificación del medio favoreciendo la proteólisis de la materia prima; la producción de ácido se consigue mediante un proceso de fermentación controlada con bacterias ácido-lácticas (BAL) sobre carbohidratos, así se obtiene un producto acidificado estable (Holguín *et al.* 2009).

Se han estudiado diferentes fuentes de carbono como harina de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, yuca, azúcar, papaya, banana y camote, pero la más empleada es la melaza por su alta composición de azúcares como glucosa, fructuosa y sacarosa (Bello *et al.* 1993; Berenz 1997; Nwanna 2003) y distintas cepas de bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, entre otras bacterias lácticas del yogur (Cira *et al.* 2002; Martínez 2003; González y Marín 2005; Llanes *et al.* 2006; Spanopoulos *et al.* 2010).

En distintos trabajos se han realizado pruebas para establecer las proporciones mínimas tanto de las fuentes de carbohidratos como del inóculo microbiano necesarias para la producción de un ensilado estable y económico. Las cantidades de melaza empleadas para obtener un ensilado son variables. Berenz (1997) establece que se requiere mínimo 10 por ciento de melaza y otros trabajos han reportado el empleo de 15 por ciento de melaza obteniendo buenos resultados (Bello 1994; Nwanna 2003; Vidotti 2003; González y Marín 2005 y Llanes *et al.* 2007). De la misma manera, diferentes autores señalan que las concentraciones del inóculo van de 10^6 a 50×10^6 UFC/mL en una relación v/p para ensilar desechos pesqueros y acuícolas (Vidotti *et al.* 2002; Llanes *et al.* 2007; Toledo y Llanes 2006). En la Figura 5 se muestra el proceso de ensilado biológico de pescado.

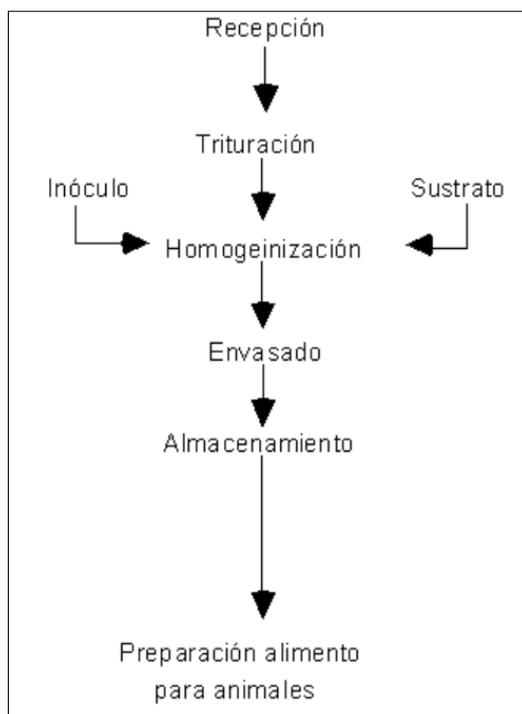


Figura 5: Proceso ensilado biológico de pescado

FUENTE: FAO (2006).

Llanes *et al.* 2007 han reportado el empleo de bacterias del yogurt para ensilar desechos de pescado que permiten obtener un ensilado estable que alcanza alrededor de 4.5 de pH. También González y Marín (2006) utilizan bacterias del yogurt para ensilar pescado y reportan un porcentaje de acidez de 3.5 a 4.0.

Nutricionalmente el ensilado biológico de pescado ha demostrado tener un alto contenido proteico, entre 40-55 por ciento base seca, (Valenzuela *et al.* 2015) y un perfil aminoacídico favorable con mayores concentraciones de aminoácidos como metionina y lisina (Vidotti *et al.* 2003) que otras fuentes proteicas, lo que indica que este producto podría ser estudiado como reemplazo de los concentrados proteicos en proporciones determinadas en la dietas de especies acuícolas (Spanopoulos *et al.* 2010) y animales de granja como pollos (Valenzuela *et al.* 2015).

Cordova y Bello (1990) al trabajar con pescados enteros o eviscerados, filetes o residuos como materia prima, los cuales fueron finamente molidos y mezclados con melaza al 15 por ciento, inóculo de *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 al 15 por ciento y ácido sórbico al 0.25 por ciento, como agente micótico, lograron la reducción del proceso a la mitad del tiempo alcanzado en el ensilado con ácidos.

De igual manera, Spanopoulos *et al.* (2010) señalan que el contenido de proteínas y lípidos en los ensilados biológicos elaborados a base de desechos de atún y tilapia tienen un perfil nutricional adecuado para especies herbívoras y omnívoras principalmente; y pueden utilizarse como suplemento parcial de la harina de pescado en dietas prácticas para organismos acuáticos. También indican que la fermentación de estos desechos es inocua y puedan emplearse como insumos en dietas para alimentación animal.

Para algunos animales como cerdos, pollos y cuyes se ha utilizado el ensilado de pescado como alimento por su mejor aprovechamiento y digestibilidad, cuya composición es esencialmente fosfatos y proteínas (Berenz 1997). Sánchez y Ochoa (2016) en un estudio sobre la formulación de dietas en la alimentación de animales monogástricos utilizando ensilado biológico de residuos del procesamiento de langostino (*Litopenaeus vannamei*), fermentados con inóculo de microorganismos comerciales (*Lactobacillos acidofilos*) y aislados del tracto digestivo del cerdo (*Enterococcus hirae*, *Lactobacillus brevis*,

Lactobacillus johnsonii, *Pediococcus pentosaceus*); experimentaron con 48 pavos (*Meleagris gallopavo*) etapa engorde, 84 gallos (*Gallus gallus domesticus*) etapa crecimiento y engorde, 16 cerdos (*Sus scrofa domesticus*) etapa crecimiento y engorde, 8 etapa gestación lactación y 64 lechones; encontraron que el uso del ensilado biológico en la alimentación de los animales en estudio no ocasionó problemas digestivos incluso con variación de la materia prima y utilizados en diferentes especies de animales según Sánchez *et al.* (2015); no se manifestaron cuadros diarreicos frecuente en lechones al destete y por último indican que la digestibilidad del alimento es inversamente proporcional al nivel de uso de ensilado biológico, siendo menor en lechones que en los animales adultos.

2.4 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA

Es un proceso celular anaeróbico en el cual la fermentación produce ácido láctico como principal producto de la transformación de hidratos de carbono. Este proceso es realizado por bacterias llamadas ácido lácticas las cuales son un grupo de bacterias Gram positivas (García *et al.*, 2010). La fermentación ácido láctica es un proceso sencillo que estabiliza y mantiene la calidad nutricional del ensilado (Fagbenro y Bello-Olusoji 1997) como el elaborado con el género *Lactobacillus*, que bio-conserva los productos.

Es un proceso celular anaeróbico en el cual la fermentación produce ácido láctico como principal producto de la transformación de hidratos de carbono (García *et al.*, 2010). La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico) y del pH es complementaria. La fermentación ácido-láctica puede recuperar algunos componentes de los desechos de pescado como proteína, quitina, minerales y lípidos (Spanopoulos *et al.* 2010).

La fermentación ácido láctica es ampliamente utilizada en la producción de alimentos, en especial de alimentos fermentados, ya que pueden producir compuestos que contribuyen con el sabor, olor, color, textura de los alimentos. Así mismo mediante esta fermentación se producen sustancias antimicrobianas, incluyendo a las bacteriocinas que tienen la capacidad de inhibir las bacterias patógenas y de deterioro de los alimentos.

Algunas cepas de bacterias ácido-lácticas son capaces de degradar las aminas biogénicas empleando las amino-oxidasas, lo que reduce la concentración de ellas, reduciendo el crecimiento de hongos, bacterias patógenas y responsables de la putrefacción, así la acidez

de la fermentación permite la estabilidad de aminoácidos, como isoleucina, treonina, cistina, metionina y lisina manteniendo valores similares a los de la harina de pescado (Vidotti *et al.* 2003), por lo que, estos ensilados pueden utilizarse como suplemento en dietas con base en harina de pescado como aporte de proteína para la nutrición acuícola.

2.4.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias Gram positivos, microaerófilicos y catalasa negativos, forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares (García *et al.* 2010).

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Ramírez *et al.* 2011). Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

Acorde a los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono las BAL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas. En el metabolismo homofermentativo, se produce predominantemente ácido láctico y las bacterias utilizan las hexosas siguiendo la vía de Embden-Meyerhof; las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylovorus*; *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, entre otros (Serna y Rodríguez 2005)

La mayoría de los *Lactobacillus* producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico; las formas isoméricas de lactato deshidrogenasa presente en *Lactobacillus* determinan el isómero de ácido láctico producido, ya que la deshidrogenasa láctica es esteroespecífica; las

especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* producen únicamente isómeros D (ver Tabla 3).

Tabla 3: Bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas y la configuración

Género y especie	Homofermentativa	Heterofermentativa	Configuración ácido láctico
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	+	-	D(-)
<i>L. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	D(-)
<i>L. casei</i>	+	-	L(+)
<i>L. plantarum</i>	+	-	DL
<i>L. curvatus</i>	+	-	DL
<i>L. brevis</i>	-	+	DL
<i>L. fermentum</i>	-	+	DL
<i>Sporolactobacillus</i>			
<i>S. inulinus</i>	+	-	D(-)
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. cremoris</i>	+	-	L(+)
<i>S. lactis</i>	+	-	L(+)
<i>Leuconostoc</i>			
<i>L. mesenteroides</i>	-	+	D(-)

FUENTE: García *et al.* (2010).

Moreira (1993) menciona que este grupo de bacterias probablemente sea el más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Para la producción industrial de ácido láctico son de mayor importancia las bacterias lácticas homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico (González *et al.* 2000). Los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias *Streptococcaceae* (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*), (Garrity 2006).

El ácido láctico se denomina ácido 2-hidroxiopropanoico y está formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, conformando un carbono asimétrico que le confiere su actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D (-) láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-) (Reddy *et al.* 2008). El isómero D (-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis y descalcificación (Panesar *et al.* 2007). El ácido L (+) láctico es clasificado por la FDA como una sustancia GRAS, generalmente reconocido como seguro para uso como aditivo alimenticio (Vijayakumar *et al.* 2008).

El ácido láctico es un ácido orgánico natural de importancia industrial en las aplicaciones farmacéuticas como electrolito y fuente de minerales; en la industria cosmética como pH buffer, antimicrobiano y rejuvenecedor de la piel; como neutralizante, solvente y agente limpiador en la industria química y en la industria alimentaria como acidulante, preservante y antimicrobiano (González *et al.* 2000), y se utiliza en una gran variedad de alimentos procesados como caramelos, productos de panadería, sopas, lácteos, cerveza, jaleas, mermeladas, mayonesas y huevos procesados (Ramírez *et al.* 2011).

El ácido láctico se puede obtener por síntesis química ó por vía fermentativa. En la actualidad se prefiere la vía fermentativa, debido a la necesidad de obtener ácido láctico ópticamente puro (Estela *et al.* 2007). El ácido láctico es de amplio uso en la industria; debido a sus características benéficas, se utiliza en la industria alimentaria (en bebidas y como conservante), en farmacia, medicina, textilera, en la industria del cuero y para la producción de plásticos biodegradables (Lederberg 2000).

La utilización de los carbohidratos disponibles y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas (Vásquez *et al.* 2009). No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Requena y Pelaez 1995). Estas últimas se han utilizado como bioconservantes en alimentos desde la década de los 80's, ya que contribuyen favorablemente en la preservación de éstos por su capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos o alterantes presentes en las materias primas, y que podrían convertirse en la flora predominante de algunos productos fermentados.

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica (Vásquez *et al.* 2009), ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agota, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Requena y Pelaez 1995; Vásquez *et al.* 2009).

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Carr *et al.* 2002).

Varios azúcares refinados tales como glucosa, xilosa, sacarosa, celobiosa y lactosa se han usado en el proceso de producción de ácido láctico. En general, la glucosa es el azúcar más utilizado por la mayoría de las cepas productoras de ácido láctico, por lo que en muchos estudios indican sólo a la glucosa como la única fuente de carbono. Sin embargo, se ha demostrado que la glucosa limita la capacidad de utilizar otros azúcares para producir ácido láctico, un fenómeno conocido como represión catabólica por carbono (Wang *et al.* 2014). Abdel-Rahman *et al.* (2011) aislaron una BAL, *E. mundtii* QU 25, que fue capaz de producir ácido L-láctico ópticamente puro a partir de glucosa, celobiosa y xilosa. Se ha demostrado que *E. mundtii* QU 25 metaboliza glucosa y celobiosa de forma simultánea con un alto rendimiento de ácido láctico ($> 0,9 \text{ g g}^{-1}$) sin subproductos.

Dentro de los metabolitos producidos por las BAL se encuentran las bacteriocinas que son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula

productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Feria 2007). El término bacteriocinogenicidad está definido como la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonicas de otros microorganismos, por lo que se podría deducir que las BAL tienen esta característica bien definida (Vásquez *et al.* 2009).

Las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80 °C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria (Gutierrez *et al.* 2005).

2.4.2 Consorcio microbiano ácido láctico (B-Lac)

El B-Lac es un consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas desarrollado por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Biorremediación perteneciente a la Facultad de Ciencias de la UNALM. Los resultados del análisis microbiológico del B-Lac se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Perfil microbiológico del B-Lac

Parámetros	Resultados
Enumeración de coliformes totales (NMP/mL)	<3
Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL)	<3
Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp (UFC/mL)	7x10 ⁷
Recuento de mohos (UFC/ ml)	<10
Recuento de levaduras (UFC/ ml)	2.5x10 ⁵
Recuento de bacterias mesófilas viables (UFC/mL)	3.3x10 ⁴

Nota: los valores <3 y <10 significan ausencia

FUENTE: García (2008).

En el análisis se observa que está elaborado principalmente a base de cepas seleccionados de bacterias del género de *Lactobacillus* (7x10⁷ UFC/ ml), así como la presencia de levaduras

(2.5×10^5) pero que no son perjudiciales (García 2008). Algunos autores señalan la utilización de mohos y levaduras para la producción de ácido láctico, estos pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces* y *Kluiveromyces* (Bianchi *et al.* 2001).

En este consorcio hay total ausencia de coliformes totales y coliformes fecales, debido al pH ácido (pH de 3.5) por la formación de ácido láctico que producen las bacterias lácticas, además de la producción de bacteriocinas y peróxido de hidrógeno que previenen el crecimiento de microorganismos patógenos.

Las bacterias mesófilas viables presentes en el B-Lac (3.3×10^4 UFC/mL) no producen ningún riesgo ya que para el consumo humano se aceptan hasta 10^5 UFC/ml (valor aceptado en la leche cruda destinada al consumo humano) (DIGESA 2003).

2.5 MELAZA DE CAÑA

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida (Fajardo y Sarmiento 2007). El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos 1990). El proceso de obtención de la melaza de caña de azúcar se presenta en la Figura 6.

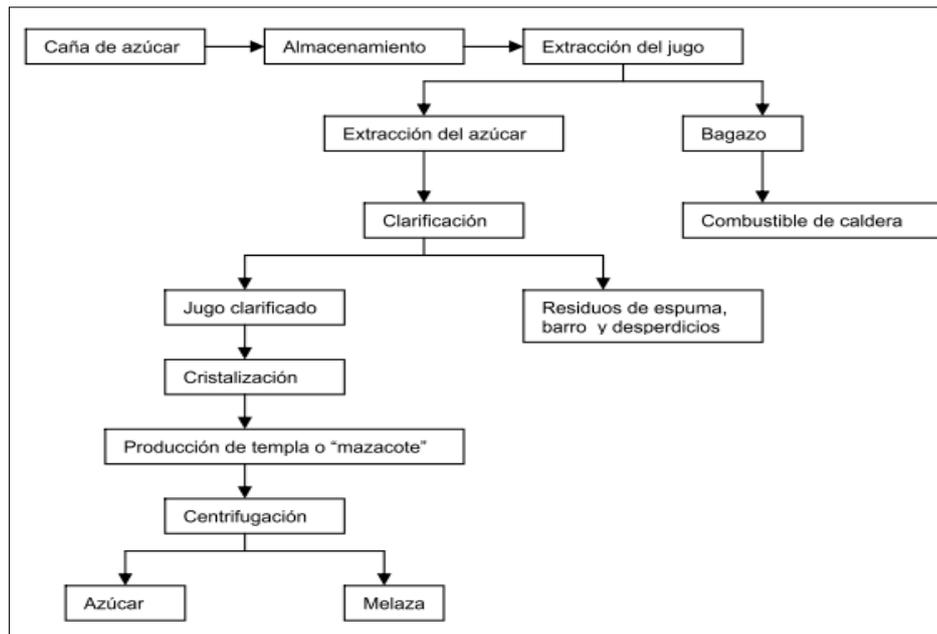


Figura 6: Proceso de obtención de la melaza de caña de azúcar

FUENTE. Swan y Karalazos (1990).

2.5.1 Composición

La composición de las melazas es heterogénea y puede variar dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix ó sólidos disueltos de 68- 75 por ciento y un pH de 5.0 - 6.1 por ciento (Fajardo y Sarmiento 2007).

Esta materia prima utilizada como sustrato completo para la producción de ácido láctico contiene sacarosa (31% p/v), glucosa (9,5% p/v), fructosa (10%) y nitrógeno (0,95%) (Dumbrepatil *et al.* 2008; Patil *et al.* 2006; Wee *et al.* 2006b; Bhatta y Srivastava 2008; Pessôa de França *et al.* 2009, citados por García *et al.* 2010). Tiene una cantidad de proteína de 3.0 %, aminoácidos, vitaminas del grupo B, además de minerales (Tabla 5).

Este subproducto de la industria azucarera presenta también en su composición cierto grado de metales pesados, como el cadmio (0.06 mg/L), plomo (2.97 mg/L) y cromo (3.00 mg/L) (Medina 2013).

Tabla 5: Composición química de la melaza de caña de azúcar

	Constituyentes	Contenido (p/p)
Análisis proximal	Proteínas	3.0%
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	Cenizas	9%
	Materia seca	78%
	Azúcares reductores	3-5 %
Contenido de aminoácidos	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Valina	0.06%
Contenido de vitaminas	Niacina	48.86 ppm
	Ácido Pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina (B6)	44 ppm
	Riboflavina (B2)	4.40 ppm
	Tiamina (B1)	0.88 ppm
	Colina	600 ppm
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Fósforo	3.67%
	Potasio	3.67%
	Magnesio	0.35%

Nota: *p/p: masa de soluto/ masa de una solución

FUENTE: Fajardo y Sarmiento (2007).

2.5.2 Aplicaciones

La melaza ha sido suministrada al ganado de carne y de leche por muchos años, principalmente como aditivo para incrementar la gustosidad o facilitar la reducción a comprimidos de las raciones convencionales mezclados en seco. Igualmente ha sido común como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos, en donde constituye un subproducto de primer orden para su alimentación, ya que puede ser utilizada a niveles hasta de 40 por ciento, logrando alimentación adecuada en los animales (Ariza y González, 1997).

Ariza y González (1997) mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias.

2.6 ASPECTOS GENERALES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas se encuentran en la naturaleza prácticamente en cualquier ambiente debido a su elevada biodiversidad y a la versatilidad fisiológica (Herrero *et al.* 1991). Dentro del término microalgas se incluyen todos los microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos y son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Abalde *et al.* 1995).

Las microalgas eucariotas son unicelulares y presentan gran variedad de formas y tamaños, así como de organización intracelular (Abalde *et al.* 1995). Contienen las estructuras y orgánulos característicos de una célula eucariota y además, algunas de ellas presentan orgánulos característicos: el pirenoide y la mancha ocular. El pirenoide, de naturaleza proteica, está asociado al cloroplasto; y la mancha ocular, compuesta por glóbulos lipídicos, se presenta en muchas microalgas flageladas (Richmond 2008).

Las microalgas procariotas tienen una organización más simple que las eucariotas. Pueden presentarse individualmente pero es más frecuente que estén asociadas en estructuras filamentosas (Abalde *et al.* 1995). En general las microalgas se pueden presentar libres en su medio o bien asociadas simbióticamente con otros organismos (Richmond 2008).

La aplicabilidad de las microalgas y sus productos ha ido en aumento, dados los avances generados por estudios bioquímicos y el desarrollo de nuevos sistemas de cultivo para la obtención de mayor producción y aprovechamiento de su biomasa (Contreras *et al.* 2003).

Las microalgas han sido descritas como microorganismos con capacidad purificadora y en algunos casos actividad antimicrobiana, tal es el caso del género *Tetraselmis* que es conocido por poseer dicha actividad. 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 por ciento de proteína y entre 15 a 23 por ciento de lípidos (Hirata *et al.* 2001).

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.

2.6.1 Fases de crecimiento microalgal

De la misma manera que bacterias y levaduras, las microalgas se reproducen principalmente por división celular, que es binaria en la mayoría de los casos, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas.

En un cultivo de microalgas del tipo *Batch*, donde hay un crecimiento celular por tiempo limitado con cambios progresivos en la composición del medio, se distinguen cinco fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o de biomasa (Arredondo y Voltolina 2007).

- a) **Fase lag o fase de adaptación:** el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo del crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo.

- b) **Fase lag o fase exponencial:** durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo debido a que las células al adaptarse al medio se duplican en intervalos iguales de tiempo. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente, aunque en general no se alcanzan valores muy elevados. Esta fase es importante debido a que el cultivo puede cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento de la densidad.

- c) **Fase de retardo o desaceleración:** en esta fase se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento (N, P, K, Fe, etc.), por lo cual las condiciones de cultivo son sub-óptimas, el tiempo requerido para duplicar la población aumenta reduciendo así la tasa de división celular aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor. En consecuencia, la actividad fotosintética reduce por el incremento de la densidad celular, por lo que la luz disponible por unidad de célula disminuye.
- d) **Fase estacionaria:** durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de autosombreado) (Arredondo y Voltolina 2007). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo (Richmond 2008).
- e) **Fase de muerte:** la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular.

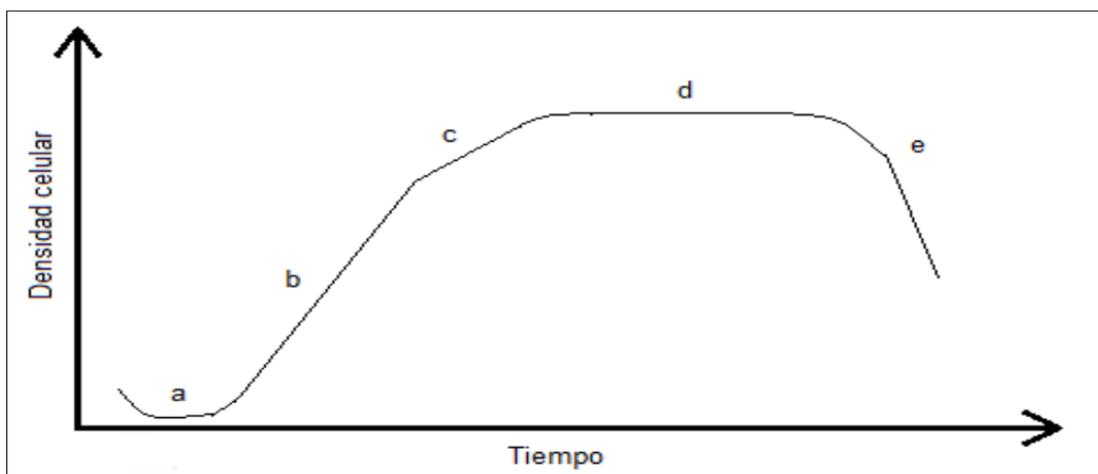


Figura 7: Fases de crecimiento de un cultivo microalgal.

FUENTE: Becker (1994).

La duración de cada fase puede alargarse, acortarse, o apenas reconocerse de diversos factores como la temperatura, fuente de luz, compuestos químicos del medio de cultivo, tamaño del inóculo o características propias de la microalga (Creswell 2010).

2.7 MICROALGA *Tetraselmis suecica*

La microalga *Tetraselmis suecica* adquiere gran importancia en la actualidad por ser una de las especies más utilizadas en la acuicultura de moluscos y crustáceos, y por su posible utilización como fuente de ácidos grasos insaturados, minerales, pigmentos, enzimas, aceites esenciales, antibióticos y otros metabolitos biológicamente activos (Bermejo *et al.* 2002). Y en los últimos años se ha despertado un gran interés por su producción a gran escala.

T. suecica es una especie muy utilizada en acuicultura y es considerada como el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala. Se emplea como alimento para larvas de moluscos y crustáceos, con un valor nutritivo considerable por su excelente composición en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Herrero *et al.* 1991).

2.7.1 Clasificación Taxonómica

Empire:	Eukaryota (Chatton 1925)
Kingdom:	Plantae (Haeckel 1866)
Subkingdom:	Viridiplantae (Cavalier-Smith 1981)
Infrakingdom:	Chlorophyta infrakingdom (Cavalier-Smith 1993)
Phylum:	Chlorophyta (Reichenbach 1834)
Sub-phylum:	Chlorophytina
Clase:	Chlorodendrophyceae (Massjuk 2006)
Orden:	Chlorodendrales (Melkonian 1990)
Familia:	Chlorodendraceae (Oltmanns 1904)
Género:	<i>Tetraselmis</i> (Stein 1878)
Especie:	<i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) (Butcher 1959)

2.7.2 Aspectos biológicos

Tetraselmis suecica se caracteriza por ser una alga Chlorofita, unicelular y móvil, de 7 a 9 µm de diámetro y 10 a 16 µm de largo (Silva *et al.* 2011). La reproducción vegetativa ocurre

por fisión longitudinal de las células que adoptan el estadio inmóvil (Díaz *et al.* 2006). Su principal importancia está en que posee las dimensiones que le permiten ser consumida por las fases larvales de los bivalvos filtradores. La producción de alimento vivo (microalgas) a gran escala es relativamente fácil, constituyéndose como una buena fuente de alimento en la acuicultura.

En su ambiente natural pueden encontrárseles en forma solitaria de nado libre, coloniales, aflageladas y sésiles; según sean las condiciones medioambientales, éstos son esféricos y presentan una pared celular bastante gruesa de naturaleza orgánica, que en algunos casos puede presentar ornamentaciones. En cultivos autotróficos puede utilizar diferentes fuentes nitrogenadas como úrea, fosfato diamónico, nitratos, nitritos, etc; y en cultivo heterotrófico como ensilado de pescado puede metabolizar diversos aminoácidos y vitaminas, sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Silva *et al.* 2011).

2.7.3 Actividad antimicrobiana

Tetraselmis ha sido extensamente descrita como una microalga con capacidad inhibitoria de bacterias, fenómeno considerado como natural (Austin *et al.* 1992). Se ha detectado actividad antibacteriana en extractos de varias algas microscópicas. Los metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas en las algas pueden funcionar como mecanismos de defensa activa y para mantener la capacidad de recuperarse y regenerarse rápidamente después del daño de depredadores o abrasión (Austin y Day 1990). Es bien sabido que los factores bióticos, como el estado reproductivo y las diferentes porciones de talo de las algas junto con factores abióticos como la estacionalidad y la ubicación geográfica pueden influir en la bioactividad de los extractos de algas (Austin *et al.* 1992).

Austin *et al.* (1992), mediante el examen de los antibiogramas preparados con extractos de *Tetraselmis suecica* confirman la inhibición (aro de inhibición de 1 a 3 mm de diámetro) contra de *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Lactobacillus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida* e *Y. ruckeri* tipo I. Las algas secadas por pulverización no estaban contaminadas con bacterias viables. Por lo tanto, se consideró que la inhibición fue producida por *Tetraselmis* en lugar de por cualquier bacteria contaminante. La inhibición fue rápida y determinaron microscópicamente que había un

efecto sobre la motilidad bacteriana (ya sea un cese o estimulación de la motilidad) en 15 minutos, acompañado de un elongación de las células. El efecto de estos productos sobre la supervivencia de los patógenos se ilustró a partir de datos de recuento de placas, donde hubo una reducción en el número de bacterias dentro de los 60 minutos de la adición de los productos algales, en comparación con los controles (Austin y Day 1990). *Tetraselmis suecica* produce una sustancia antibacteriana soluble en agua, que se extrae en acetato de etilo y se concentra por evaporación rotatoria a 60 ° C, además señalan que es una sustancia cristalina de olor dulce con un tono amarillento (Austin *et al.* 1992). Después de algunos análisis iniciales, determinaron que la sustancia inhibidora es un polisacárido, que comprendía anillos de azúcar y posiblemente acetato.

La actividad antibacteriana en un estudio se observó predominantemente en las clases de algas Prasinophyceae y Bacillariophyceae, siendo la especie *Tetraselmis* la más notable de la clase anterior (Kellam y Walker 1989).

2.8 PARÁMETROS DE CULTIVO

Las microalgas requieren para su correcto crecimiento una balance adecuado de diferentes nutrientes y condiciones ambientales. Los factores que más influyen en la producción son: Luz, temperatura, pH, salinidad, fuente de carbono, nutrientes del medio de cultivo, características del inóculo, agitación, evaporación y contaminación (Abalde *et al.* 1995).

2.8.1 Luz

La luz es el factor de producción más importante (Richmond 2008), es considerado el nutriente limitante cuando se trata de cultivo de microorganismos fotosintéticos. El aporte, distribución y utilización de la luz es un aspecto de mayor importancia en la producción de biomasa microalgal (Abalde *et al.* 1995).

La intensidad lumínica incidente requerida para los cultivos iniciales es de 1000 lux, para volúmenes más grandes varía entre 500 a 10 000 lux. Estos varían de acuerdo al volumen y la densidad del cultivo; a mayor volumen y mayor concentración de células en el cultivo será necesaria mayor intensidad luminosa. Velasco *et al.* (2009) en el cultivo de *Isochrysis*

galbana señala que el crecimiento microalgal fue mayor en los tratamientos de alta intensidad lumínica (1024 lux) en comparación con los de baja iluminación (24 lux).

La iluminación puede obtenerse con dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría de 30 a 40 Watts son los más utilizados por que proporcionan más espacio útil, estos alcanzan mejor el rango de longitud de onda (400-700 nm) necesario para la fotosíntesis (Plasencia 2012) .

2.8.2 Temperatura

La temperatura es un parámetro del cultivo que presenta una estrecha relación con el resto de los parámetros, sobre todo con la luz y los nutrientes. La temperatura óptima del cultivo depende principalmente del microalga que se emplee y de sus características, pero por otra parte el valor óptimo puede variar en función de los valores de los demás parámetros. Así la temperatura óptima en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural. Generalmente las temperaturas de cultivo en condiciones naturales varían desde 10 a 35°C y en condiciones de cultivo, entre 16°C y 24°C aproximadamente. Una temperatura no adecuada al cultivo, afecta la tasa de metabolismo y por lo tanto su crecimiento y reproducción.

Uno de los aspectos de mayor influencia en la temperatura óptima es el grado de iluminación. Con niveles de iluminación bajos la temperatura óptima presenta valores menores que cuando la iluminación es alta. El punto de saturación lumínica se alcanza a valores menores cuando la temperatura es baja, y viceversa. Existe un nivel de iluminación óptimo para cada temperatura de cultivo (Abalde *et al.* 1995).

De esta manera, Velasco *et al.* (2009) en el cultivo de *I. galbana* bajo condiciones de mayor intensidad lumínica, señala que la alta temperatura ocasionó un aumento en la tasa fotosintética por encima de la tasa respiratoria dando como resultado mayores densidades algales que en condiciones de baja temperatura. Contrariamente, en los tratamientos de baja luminosidad, la alta temperatura provocó el aumento en la tasa de respiración celular, por encima de la tasa de fotosíntesis, ocasionando bajos crecimientos y densidades celulares que en condiciones de baja temperatura.

2.8.3 pH

La importancia del pH en el cultivo de microalgas se debe a que en función de su valor variará la disponibilidad de los nutrientes y la solubilidad de los gases (afectada también en función de la temperatura). Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo estar entre pH 7.0 y 9.0 para la mayoría de especies (Park *et al.* 2011). Los valores de pH por encima del óptimo son tolerados mejor que los descensos de pH, que suelen ser letales (Abalde *et al.* 1995).

El pH puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO₂, o incluso, con adicción de ácido o base permitiendo además, suministrar CO₂ necesario para cultivos de alta productividad (Richmond 2008).

Según Velasco *et al.* (2009) los valores de pH en el cultivo tienden a aumentar con la edad de los cultivos expuestos a una alta iluminación, mientras que aquellos sometidos a baja iluminación presentan el patrón inverso. A medida que el cultivo se desarrolla también se aumenta la actividad fotosintética. Las condiciones en el medio de cultivo cambian, ocurriendo desequilibrio químico, esto está relacionado con la disponibilidad de nutrientes (macro y micro) y su agotamiento durante el desarrollo del cultivo. El pH tiende a incrementarse en el tiempo pero es usualmente controlado por el dióxido de carbono (CO₂) que actúa como buffer.

2.8.4 Salinidad

La tolerancia a las variaciones en salinidad de las especies de microalgas suelen variar entre 12 a 40‰, con un punto óptimo alrededor del 20 ‰. Velasco *et al.* (2009) sobre la falta de efecto de la salinidad sobre el crecimiento celular de *I. galbana* coincide con los resultados obtenidos bajo rangos de salinidades más amplios, entre 10 y 35 ‰ (Renaud *et al.* 1994).

Los valores extremos de salinidad afectan negativamente las tasas de fotosíntesis, respiración y crecimiento de las microalgas marinas (Helm y Bourne 2006). Mientras que la exposición a medios con bajas salinidades ocasiona el hinchamiento de las células e incluso su explosión, los medios hipertónicos producen la deshidratación de las mismas (Richmond

2008). Rodríguez *et al.* (2007) en el cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizó agua de mar al 20 %, obteniendo buenos resultados en biomasa.

2.8.5 Aireación

Cuando no hay limitaciones de otro tipo el mezclado es el factor determinante de la producción (Suh y Lee 2003). El mezclado incrementa la producción al incidir principalmente en dos aspectos: incrementa la frecuencia de exposición de las células a la luz y favorece la transferencia de masa entre los nutrientes y las microalgas (Plasencia 2012).

La solución que emplea bombas de aire es quizás la más interesante debido a que se puede llevar a cabo introduciendo CO₂ (como fuente de carbono) en el cultivo además de aire. La introducción de CO₂ como fuente de carbono es interesante porque aumenta sustancialmente la productividad además de mantener el pH en niveles adecuados 7.5-8.0 (Abalde *et al.* 1995).

El mezclado genera un papel importante en los ciclos de luz/oscuridad. Recientemente se ha evaluado la interacción de la iluminación aplicada en pulsos con la turbulencia generada en el mezclado, viéndose que en fotobiorreactores de paso lumínico estrecho, se pueden emplear intensidades lumínicas crecientes si se genera una turbulencia creciente a la vez (Richmond 2008).

2.8.6 Nutrientes

Las microalgas no presentan unos requerimientos nutricionales complejos, pero al igual que cualquier otro tipo de cultivo, sus necesidades serán mayores cuánto más intensivo sea el cultivo. Los nutrientes necesarios se pueden incluir en dos grupos principales: macro y micronutrientes. Esta clasificación se hace en función de la cantidad que se requiera de cada uno de ellos. Los macronutrientes forman parte de las moléculas estructurales y son el carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y fósforo, así como calcio, magnesio, azufre y potasio. Los micronutrientes son necesarios en pequeñas cantidades pero su importancia es vital para el desarrollo y la actuación de enzimas, así como factores de crecimiento.

Principalmente son manganeso, hierro, cobre, molibdeno y cobalto, pero es frecuente la inclusión en la formulación de vitaminas y en algunos casos antibióticos.

Los macronutrientes H y O generalmente no se tienen en cuenta en la preparación del medio de cultivo porque se están presentes en el agua del medio y en el aire empleado en el mezclado. Algo similar ocurre con el C, si se emplea fertilización carbónica no es necesario incluirlo en la formulación del medio.

Carbono

El carbono presenta una gran importancia debido principalmente a dos factores: es el nutriente más importante porque supone el 50 por ciento de la biomasa (Abalde, *et al.* 1995) y la forma de aplicación es un factor definitorio del tipo de cultivo. El carbono se puede aplicar en dos formas principales: inorgánico como CO₂; u orgánico en forma de azúcares o acetato. Si se emplea el carbono en forma inorgánica se está llevando a cabo un cultivo fotoautótrofo, y si la fuente principal de carbono se encuentra en forma orgánica el cultivo será heterótrofo si además el carbono es fuente de energía; o bien será mixotrófico si la energía proviene tanto de la fotosíntesis como del carbono orgánico.

Nitrógeno

El nitrógeno es el segundo componente mayoritario en la biomasa de las microalgas. Generalmente se aplica en forma inorgánica, pero se puede aplicar en forma orgánica como urea. La forma de asimilación del nitrógeno es como amonio por lo que cuando se aplica el nitrógeno como nitrito o nitrato debe reducirse primero.

El nitrógeno, que generalmente representa alrededor del 7-10 por ciento del peso seco de la célula, es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de las algas (Richmond 2008). El nitrógeno de amoníaco suele ser la fuente de nitrógeno preferida para los microorganismos y la asimilación de NO₃⁻ o NH₄⁺ está relacionada con el pH del crecimiento. Cuando se usa amoníaco como única fuente de N, el pH podría disminuir significativamente durante el crecimiento activo, debido a la liberación de iones H⁺. Este fenómeno se ha utilizado como una medida para controlar el crecimiento

de invertebrados herbívoros después de su invasión en cultivos de algas en masa. Se produce un aumento en el pH cuando se suministra nitrato como la única fuente de nitrógeno. Un factor que puede ser importante a la hora de decidir si suministrar nitrato o amoníaco, es que este último podría perderse en los medios de crecimiento debido a la volatilización, particularmente cuando el pH aumenta. Si el suministro de NO_3^- o NH_4^+ es energéticamente beneficioso para el crecimiento de biomasa algal no se perjudican y las tasas de producción son similares.

Las respuestas típicas a la limitación de nitrógeno son la decoloración de las células (disminución de las clorofilas y un aumento de los carotenoides) y la acumulación de compuestos de carbono orgánico como polisacáridos y ciertos aceites. En general, cuando las microalgas crecen bajo condiciones de nitrógeno limitado, el efecto más llamativo es la degradación activa y específica de los fitobilisomas (Collier y Grossman 1992).

Sin embargo, algunas especies de algas aumentan sus carbohidratos en lugar de su contenido de lípidos en condiciones de agotamiento de nitrógeno, muchas cepas de *Dunaliella*, en las que se pueden acumular grandes cantidades de glicerol junto con un aumento de mono, di y polisacáridos en condiciones de crecimiento limitado de nitrógeno (Richmond 2008). Dentro de un solo género de *Chlorella*, por ejemplo, se descubrió que algunas cepas acumulan grandes cantidades de almidón, bajo la inanición de nitrógeno, mientras que otras acumulan lípidos neutros (Richmond 2008).

La acumulación de carotenoides secundarios es otra característica principal de muchas algas cuando crecen en condiciones de nitrógeno limitado, lo que a menudo va acompañado de una disminución en el contenido de clorofila de las células. Ben-Amotz *et al.* (1982) demostraron que se producía una producción mejorada de b-caroteno en células de *Dunaliella* privadas de nitrógeno. Esters *et al.* (2002) demostraron que la baja concentración de nitrógeno es un factor importante para estimular la síntesis y la acumulación de astaxantina y sus ésteres acílicos en *Haematococcus pluvialis*.

Fósforo

El fósforo es un actor principal en los procesos de transferencia de energía y en el material genético (Plasencia 2012). La forma preferida en la que se suministra a las algas es como ortofosfato (PO_4^{2-}) y su absorción depende de la energía.

Aunque la biomasa de las algas contiene menos del 1 por ciento de fósforo, a menudo es uno de los factores limitantes del crecimiento más importantes en la biotecnología de las algas. Esto se debe a que está fácilmente unido a otros iones (por ejemplo CO_3^{2-} y Fe) que resulta en su precipitación y, en consecuencia, hacer que este nutriente esencial no esté disponible para la absorción de algas. El suministro de fósforo también influye en la composición de la biomasa producida, especialmente en el contenido de lípidos y carbohidratos que se ven afectados por suministros externos e internos de fósforo. También es importante la proporción de N:P en los medios de crecimiento, ya que determina la productividad potencial (Borowitzka 1988, citado por Richmond 2008).

Algunos de los síntomas de la deficiencia de fósforo son similares a los observados en cultivos deficientes en nitrógeno. El contenido de clorofila *a* tiende a disminuir mientras que el contenido de carbohidratos aumenta en células eucariotas y procariotas. En contraste con la limitación de nitrógeno, se produce poca degradación de fitobilisomas durante el agotamiento del fósforo. Ben-Amotz *et al.* (1982) señala que la deficiencia de fósforo resultó en la acumulación de b-caroteno en células de *Dunaliella* y la acumulación de astaxantina en células de *Haematococcus*, pero no notablemente en comparación con la deficiencia de nitrógeno.

El resto de nutrientes presentan una importancia menor en cuanto a que su presencia y disponibilidad es incuestionable pero su relevancia en el cultivo es menor. El azufre y el calcio toman parte en la división celular. El magnesio forma parte de la clorofila y por ellos afecta en la función fotosintética. El hierro, micronutriente, es imprescindible en la fotosíntesis (Abalde *et al.* 1995). Aparte de los nutrientes generales, cada especie o grupo de microalgas puede presentar unos requerimientos específicos.

Se han desarrollado multitud de medios de cultivo a partir de numerosas combinaciones de nutrientes, pero los factores determinantes del éxito de un medio de cultivo, aparte de la característica obvia de que permita y favorezca el crecimiento, son la facilidad de preparación y su bajo coste de producción

2.9 MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo es una disolución acuosa que transporta los nutrientes que necesitan las microalgas para su crecimiento. El suministro de medio de cultivo y las concentraciones de los nutrientes deben estar acoplado con la producción de biomasa de forma que se suministren en cantidad suficiente para que nunca se produzca una limitación que tendría como consecuencia una disminución en la productividad de biomasa o incluso alguna disfunción del cultivo como la fotoinhibición.

En la investigación a nivel laboratorio con microorganismos pueden utilizarse productos químicos definidos puros para la obtención de medios de cultivo, pero a nivel industrial se utilizan substratos complejos, por motivos económicos. Un medio de cultivo óptimamente equilibrado es necesario para una producción eficiente. Existe una gran cantidad de medios de cultivo para microalgas, los cuales muestran ligeras modificaciones cualitativas y cuantitativas de los nutrientes entre los medios (Herrero *et al.* 1991).

El agua de mar es el medio más usado para el cultivo de microalgas, aunque generalmente no contiene las concentraciones de nutrientes necesarias para favorecer la producción de biomasa. Algunos autores recurren a las prácticas de enriquecimiento o abonado del medio con disoluciones de macro y micronutrientes (Sánchez *et al.* 2008; Silva *et al.* 2011).

2.9.1 Enriquecimiento

El enriquecimiento de medios de cultivo se clasifica según su procedencia del medio, siendo natural si se utiliza agua de mar o artificial si se utilizan sustitutos para preparar una solución equivalente (Sánchez *et al.* 2008). También dependiendo de la fuente de origen de los nutrientes adicionados, el enriquecimiento se clasifica en orgánico e inorgánico.

Enriquecimiento Natural

Se caracteriza porque utiliza agua de mar el cual se le adiciona macronutrientes inorgánicos (amonio, nitratos, fosfatos, sulfatos y silicatos) y micronutrientes inorgánicos (cloruro férrico, quelatos como EDTA) y orgánicos (cianocobalamina, biotina y tiamina HCl). Las más utilizadas se derivan del cultivo f/2 de Guillard por ser uno de los más adecuados para el cultivo de la mayoría de las microalgas, pero existe una gran variedad como el H/2, Allen & Nelson, entre otros (Hoff y Snell 1993 citado por Rodríguez *et al.* 2007).

Enriquecimiento artificial

Se utiliza agua de mar a la que se le adiciona sales artificiales y otros nutrientes de crecimiento. Los medios de naturaleza artificial de composición conocida son empleados comúnmente como aditivos para medios naturales de composición química conocida. El medio "NH" de Gates y Wilson, se utiliza para distintas microalgas en el Laboratorio de Galveston del National Marine Fisheries Service. Otro medio muy usado es Instant Ocean TM, que es una combinación de sales de mar sintéticas y el medio "F" de Guillard (Fenucci 1988).

Enriquecimiento orgánico

Se caracteriza porque se utiliza agua de mar a la que se le adiciona suplementos orgánicos como diversas harinas (de pescado, soya, lombriz de tierra, girasol), gallinaza, gas, aceites, melaza de caña, exudados gomosos (Herrero *et al.* 1991) y residuos pesqueros como la sanguaza (Silva *et al.* 2011) y el ensilado biológico (Sánchez *et al.* 2008).

Sánchez *et al.* (2008) evaluaron el efecto de las diversas concentraciones de medios de cultivo, concluyendo que el agua de mar enriquecido con ensilado biológico de pescado tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la microalga *Nannochloropsis oculata*, lo que indica que puede suministrar los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo y que el ensilado biológico de pescado puede ser usado como medio de producción masiva para dicha microalga. De igual manera, Silva *et al.* (2011) utilizaron sanguaza con agua de mar en una concentración de 3.5 por ciento (v/v) como medio de cultivo, obteniendo un crecimiento máximo (log N/N) de 0.659 de la microalga *Tetraselmis suecica*.

Enriquecimiento Inorgánico

Se caracteriza porque se utiliza agua de mar y se le adiciona fertilizantes inorgánicos comerciales agrícolas como la urea, nitrato de amonio, superfosfato, sulfato de amonio entre otros; en diferentes concentraciones (Chinchayan 1996).

2.10 TIPOS DE CULTIVO

2.10.1 Cultivo en lote

Este es el método más común para el cultivo de microalgas. En un sistema de cultivo discontinuo simple, en donde se coloca una cantidad limitada de medio de cultivo y un inóculo de algas en un recipiente de cultivo, y se incuba en un entorno favorable para el crecimiento. Se necesita alguna forma de agitación, como la agitación o la mezcla del impulsor, para garantizar el intercambio de nutrientes y gases en la interfaz célula-agua.

Los sistemas de cultivo *Batch* son ampliamente aplicados debido a su simplicidad y flexibilidad, permitiendo cultivar diferentes especies y solucionar defectos rápidamente en el sistema. El recipiente de cultivo puede ser un simple matraz cónico o un fermentador controlado por el medio ambiente. En un cultivo fotosintético o mixotrófico, el CO₂ se suministra agitando el cultivo continuamente con aire enriquecido con CO₂ (por ejemplo, 5% v/v de CO₂ en aire). El cultivo puede ser iluminado externamente por fuentes de luz, naturales o artificiales, o luz solar a través de fibra óptica (Ogbonna *et al.*, 1999 citado por Richmond 2008), colocados en los recipientes de cultivo. Las diferentes fases, que pueden ocurrir en un cultivo por lotes (ver punto 2.5.1), reflejan los cambios en la biomasa y en su entorno.

2.10.2 Cultivo continuo

En cultivos de flujo continuo, se suministra medio de cultivo fresco al cultivo mixto homogéneo y el cultivo es removido continuamente o intermitentemente. El enfoque se basa en las observaciones de que los sustratos se agotan y los productos se acumulan durante el crecimiento. Eventualmente, el crecimiento del cultivo cesa debido al agotamiento del sustrato limitante del crecimiento o la acumulación de un producto inhibitorio del crecimiento. Para mantener el crecimiento celular, el sustrato limitante debe reponerse y el producto

inhibidor del crecimiento debe eliminarse o diluirse agregando medio de cultivo nuevo (Richmond 2008).

2.10.3 Cultivo inmovilizado

Varias especies de microalgas han sido atrapadas exitosamente en geles de polisacáridos (alginato de calcio o bario, agar, carragenano) o polímeros sintéticos (acrilamida, resina fotorreticulable, uretano) mostrando una estabilidad y productividad mejorada (Robinson *et al.*, 1986). El alginato de calcio se usa ampliamente para el atrapamiento de células de algas, ya que no requiere tratamiento térmico en el proceso de atrapamiento y no es tóxico. Las perlas de alginato proporcionan un microambiente protector y estable que permite que las células crezcan a una velocidad específica de crecimiento más rápida, a una temperatura de cultivo más alta y en condiciones de alto cizallamiento (Ding & Lee 1994, citado por Richmond 2008).

La inmovilización de las microalgas ha sido reportada como una efectiva técnica que aumenta la remoción de nutrientes en comparación a la misma sin inmovilizar. Las microalgas inmovilizadas permitirían una mejor cosecha de la biomasa, pero no presentan diferencias nutritivas en la cantidad de proteínas y lípidos, ni en la actividad fotosintética entre células inmovilizadas y libres. (Ruiz-Marin *et al.* 2010). El análisis del contenido de proteínas y lípidos sugiere que, desde un punto de vista práctico, los sistemas inmovilizados podría facilitar la separación de la biomasa de las aguas residuales tratadas, aunque en términos de valor nutritivo de la biomasa, los sistemas inmovilizados no representan una ventaja sobre sistemas celulares.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La parte experimental del presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Biorremediación perteneciente a la Facultad de Ciencias y en el Laboratorio de Acuicultura, en el Área de Alimento vivo perteneciente a la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 Materia prima e insumos

- Elaboración del ensilado
 - Residuos del fileteado de lisa: comprende cabeza, vísceras, aletas, cartílago, espinas, piel, sangre, entre otros., procedente del mercado Santa Rosa de La Molina.
 - Microorganismos: conformado por un consorcio de bacterias ácido lácticas (B-Lac), elaborado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Biorremediación perteneciente a la Facultad de Ciencias -UNALM.
 - Melaza de Caña: proveniente del establo de la Universidad Nacional Agraria La Molina-UNALM.

- Cultivo de microalgas
 - Cepa de microalga *Tetraselmis suecica*: proveniente del stock de inóculos mantenidos en el Laboratorio de Acuicultura, en el Área de Alimento vivo - UNALM.

3.2.2 Reactivos químicos

- Solución buffer de pH 7.01 Hanna Instruments HI 7007
- Solución buffer de pH 4.01 Hanna Instruments HI 7007
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N de 1L

- Fenolftaleína

3.2.3 Materiales

Elaboración del ensilado

- Envases de plástico de 1 litro con tapa
- Baldes de 5 y 8 litros
- Bidones de 10 litros
- Bolsas de plástico de 25 x 38 cm
- Agua de mesa sin gas
- Agua destilada
- Termómetro de mercurio
- Ligas de Hule
- Paleta mezcladora de metal
- Bureta de vidrio de 30 mL
- Pipetas Pasteur descartables
- Tubos de ensayo de 15 mL
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas quirúrgicas
- Embudos y coladores
- Papel toalla
- Etiquetas autoadhesivas

Cultivo de microalgas

- Agua marina (obtenida del Laboratorio de Acuicultura)
- Agua desionizada
- Agua destilada
- 15 matraces Kitasato de 250 ml y 300 ml
- 2 matraces Kitasato de 2 L
- 10 pipetas de 1 mL y pipetas pásteur
- Placas Petri
- Probetas de 100 y 50 mL
- Manguerillas de 5mm de diámetro
- Ácido acético (vinagre- para fijar muestras)

- Hipoclorito de sodio (lejía comercial)
- Alcohol 96°
- Detergente lava vajilla
- Filtros para aire de 1 μm
- Filtros de papel 0.45 μm de diametro
- Válvulas de aire y conectores
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Papel toalla, papel kraft, algodón
- Medio de Yashima

3.2.4 Equipos

- Elaboración del ensilado
 - Potenciómetro marca Hanna Instruments modelo HI 8424
 - Balanza electrónica modelo LPCR 20
 - Estufa eléctrica, Barnstead
 - Licuadora semi industrial
 - Bioreactor de acero inoxidable de 40 L de capacidad con control automático de temperatura y revolución de construcción local.

- Cultivo de microalgas
 - Refractómetro marca ATAGO
 - Bomba de vacío
 - Refrigerador
 - Microscopio binocular
 - Balanza analítica
 - Cámara de Neubauer o hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad
 - Autoclave marca KENDALL
 - Termómetro de alcohol escala de 0-50 °C, con aproximación $\pm 0.1^\circ\text{C}$ Marca Precisión.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Medición del pH

Se determinó por el método potenciométrico, introduciendo el electrodo del pHmetro en cada muestra homogenizada. La lectura del pH se considera válida cuando el valor se mantiene constante por un tiempo aproximado de 10 segundos. Previo a la medición, el potenciómetro será calibrado utilizando las soluciones buffer de pH 7.01 y pH 4.01. Finalmente se enjuagó el electrodo con agua destilada después de cada uso.

3.3.2 Medición del porcentaje de acidez láctica

Para determinar el porcentaje de acidez titulable de las muestras de la fermentación se realizó acorde a los principios del método estandarizado 942.15 (AOAC 2007). Se pesó 5 g de la muestra y se diluyó con agua destilada hasta alcanzar 50 mL de solución y se tomó una alícuota de 20 mL, el cual se centrifugó a 5000 RPM por cinco minutos y luego se centrifugó a 10 000 RPM por 10 minutos. En la titulación potenciométrica el titulante fue hidróxido de sodio NaOH 0.1 N y los niveles de pH alcanzados se encontraron en el rango 8.1 ± 0.02 . El porcentaje de ácido láctico en cada muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{G \times N}{m} \times 0.09 \times 100$$

Dónde:

G = gasto de NaOH (ml)

N = normalidad del NaOH

m = masa de la muestra (g)

0.09= factor de conversión del ácido láctico

3.3.3 Tasa específica de crecimiento poblacional (μ)

La tasa específica de crecimiento poblacional (μ) se calculó con la siguiente fórmula descrita por Fogg (1965):

$$\mu = (\text{Log } N_f - \text{Log } N_o) / (T_f - T_o)$$

Dónde:

N_f = densidad celular en T_f

N_o = densidad celular en T_o

T_o = tiempo inicial de la fase exponencial

T_f = tiempo final de la fase exponencial.

Los tiempos inicial y final de la fase exponencial correspondieron respectivamente al primer valor positivo y al valor máximo de las tasas de crecimiento finito ($\Delta N/\Delta t$) promedio.

3.3.4 Análisis físico químico

Macroelementos

- **Nitrógeno total:** por el método de Kjeldahl (AOAC 977.02, 1990).
- **Fósforo total:** por el método de color amarillo de vanadato-molibdato (APHA, 1992).
- **Potasio, calcio y magnesio:** por el método de lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica (APHA, 1992).

Microelementos

- **Hierro, cobre, zinc, manganeso:** por el método de calcinación y extracción con ácido y lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica (APHA, 1992).
- **Boro:** por el método del espectrofotómetro (APHA, 1992).

Metales pesados

- **Plomo, cadmio y cromo:** por el método de espectrometría de absorción atómica (APHA, 1992).

3.3.5 Análisis químico proximal

La composición química proximal del ensilado de residuos de lisa comprendió los siguientes análisis:

- **Humedad:** Por el ME.Q. 13/01 Grav. Microondas, validado y acreditado de acuerdo a los requisitos de la norma ISO 17025.
- **Proteína:** Por el ME.Q. 18 Método de Kjeldhal, validado y acreditado de acuerdo a los requisitos de la norma ISO 17025.
- **Grasa:** Por el ME.Q. 16 Extrac. éter etílico, validado y acreditado de acuerdo a los requisitos de la norma ISO 17025.
- **Cenizas:** Por el ME.Q. 15 Grav. Calcinación, validado y acreditado de acuerdo a los requisitos de la norma ISO 17025.
- **Hidratos de carbono:** Por el ME.Q. 20 Cálculo, validado y acreditado de acuerdo a los requisitos de la norma ISO 17025.

3.3.6 Análisis microbiológico

- **Enumeración de coliformes totales (NMP/mL):** en medio Caldo bilis verde brillante a 37°C por 24-48 horas (ICMSF, 2000).
- **Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL):** en medio Caldo lactosa bilis verde brillante a 45°C por 24-48 horas (ICMSF, 2000).
- **Enumeración de *Escherichia coli* (NMP/mL):** en medio Caldo Brilla Fluorocult a 45°C por 48 horas (ICMSF, 2000).
- **Recuento de *Lactobacillus sp.* (UFC/mL):** en medio Agar MRS incubado en condiciones anaeróbicas a 30°C por 5 días (ICMSF, 2000).
- **Recuento de Mohos y levaduras (UFC/mL):** en medio Agar OGY, se incuba a 20-24°C por 3-7 días (ICMSF, 2000).
- **Detección de *Salmonella sp.* en 25 g:** (ICMSF, 2000).

3.4 PROCEDIMIENTO

El presente trabajo de investigación se dividió en tres etapas experimentales.

3.4.1 Primera etapa

a) Determinación de las proporciones de melaza y B-Lac.

En esta primera etapa se determinó los porcentajes óptimos de melaza y de B-Lac necesarios para la elaboración de un ensilaje de residuos de pescado. Los pasos seguidos para la elaboración del ensilado biológico se muestra en la Figura 8.

A continuación, se realizará una breve descripción de cada uno de los pasos del flujograma experimental:

- **Molienda:** los residuos frescos del fileteado de lisa (cabeza, vísceras, aletas, cartílagos, espinas, etc.) fueron triturados en una licuadora semi industrial hasta formar una masa homogénea.
- **Mezclado:** Los tratamientos se generaron al combinarse 3 niveles de B-Lac (5%, 10%, 15%) y 3 niveles de melaza de caña (5%, 10%, 15%) tomando como base 300 g de la mezcla homogénea de residuos de lisa. Los tratamientos fueron preparados por triplicado y se presentan Tabla 6.
- **Homogenización y envasado:** en envases de plástico de 1 kg de capacidad, se mezcló la materia prima, melaza y B-Lac con ayuda de una bagueta hasta lograr su homogenización. Con la finalidad de minimizar la presencia de oxígeno se cubrió con plástico cada mezcla y se cerró con tapa para luego ser llevados a la estufa.
- **Incubación a 40°C:** todos los tratamientos tapados se colocaron en estufa a 40°C por 5 días. Los principales parámetros evaluados fueron pH y porcentaje de acidez titulable (expresada en ácido láctico). En paralelo se evaluó el color, aroma y consistencia del ensilado.
- **Almacenamiento:** terminado el tiempo de incubación, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 25 días, con el objetivo de evaluar la estabilidad del producto.

Tabla 6: Tratamientos utilizados para determinar los porcentajes de melaza y B-Lac

B-Lac	Melaza								
	5 (%)			10 (%)			15 (%)		
5 (%)	T1	T1	T1	T4	T4	T4	T7	T7	T7
10 (%)	T2	T2	T2	T5	T5	T5	T8	T8	T8
15 (%)	T3	T3	T3	T6	T6	T6	T9	T9	T9

b) Selección de los mejores tratamientos

A partir de los resultados obtenidos de pH y acidez láctica obtenidos durante la evaluación de 30 días, se seleccionó el mejor tratamiento tomando en consideración los siguientes criterios señalados por García (2008):

- El pH debe ser menor o cercano a 4.5 para ser considerado buen tratamiento.
- No debe presentarse mal olor ni olores fuertes.
- No debe formar burbujas en la superficie.
- No debe presentarse colonias de microorganismos como mohos o levaduras.

También se evaluó como criterio de selección el mayor aprovechamiento de los residuos de lisa en cada tratamiento, dándole prioridad a los que tenían el menor nivel de B-Lac en su composición, ya que es el insumo menos accesible y con un costo más elevado en comparación con la melaza.

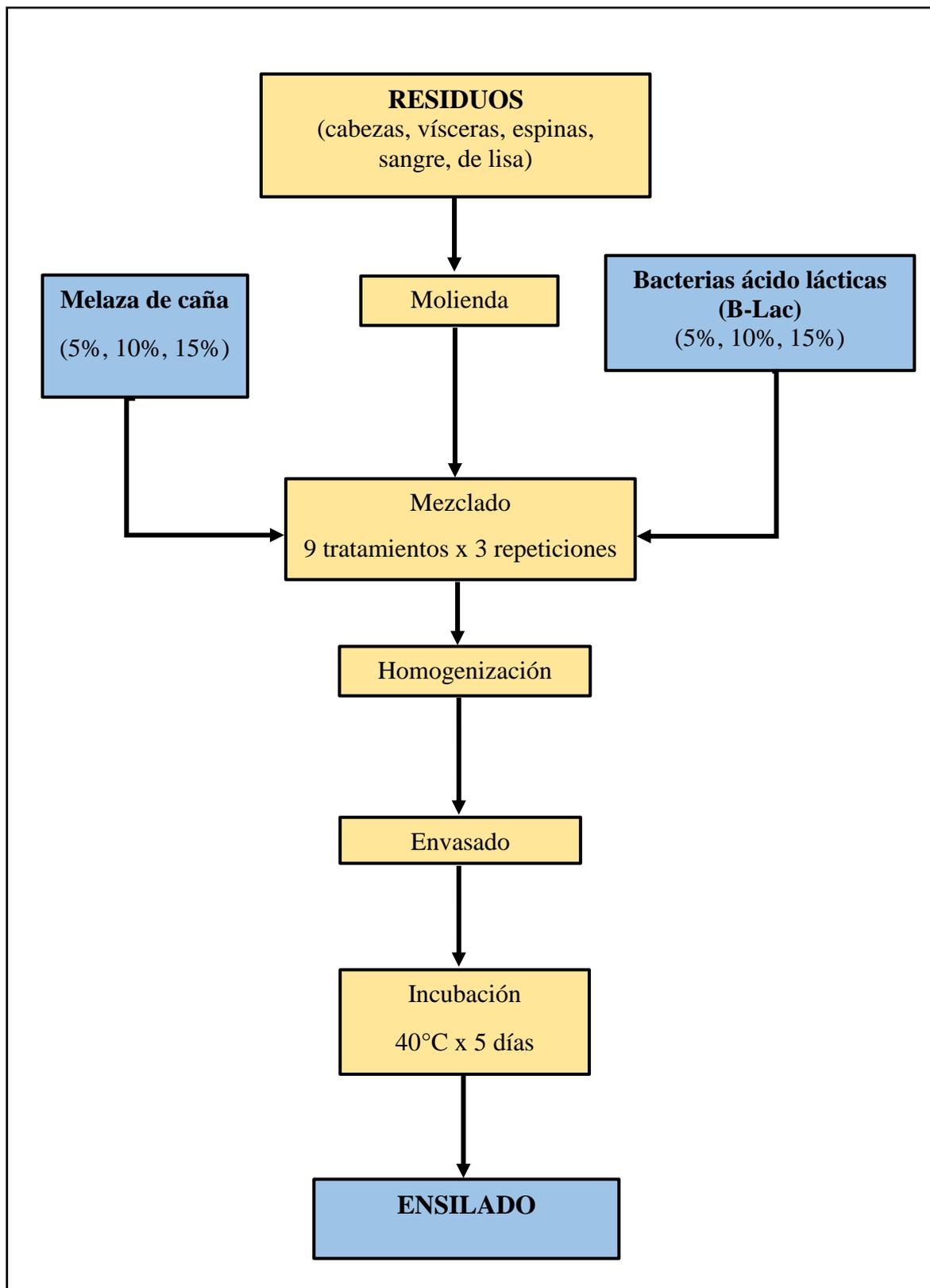


Figura 8: Flujograma experimental de la elaboración del ensilado de pescado para la primera etapa

3.4.2 Segunda etapa

a) Producción del ensilado de residuos de lisa a escala piloto

Una vez determinado el mejor tratamiento de la primera etapa según los criterios anteriormente mencionados, se procedió a la producción de ensilado en un biorreactor de acero inoxidable de 40 L de capacidad (con controles automáticos de temperatura y agitación) ubicado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Biorremediación perteneciente a la Facultad de Ciencias de la UNALM.

Se utilizaron 16 kg residuos frescos del fileteado de lisa, los cuales no fueron triturados ni molidos. El B-Lac y la melaza se añadieron en los porcentajes correspondientes al tratamiento seleccionado. Se colocaron todos los ingredientes en el biorreactor a temperatura de 60 °C por una hora para acelerar la hidrólisis proteica y eliminar los microorganismos de los residuos de pescado, luego se puso a fermentar a 40°C por 5 días, se procedió a separar las partes duras que no se hidrolizaron como los huesos y las espinas. Se utilizó un colador para separar los sólidos de mayor tamaño de la parte líquida. Los sólidos separados fueron pesados y se calculó el porcentaje de los residuos no hidrolizados. Se midió el volumen de la parte líquida y se calculó la relación: ensilado líquido/ residuo inicial de pescado. También se evaluaron el pH y el porcentaje de acidez láctica durante los cinco días de evaluación.

Los pasos seguidos para la producción del ensilado se presentan en la Figura 9.

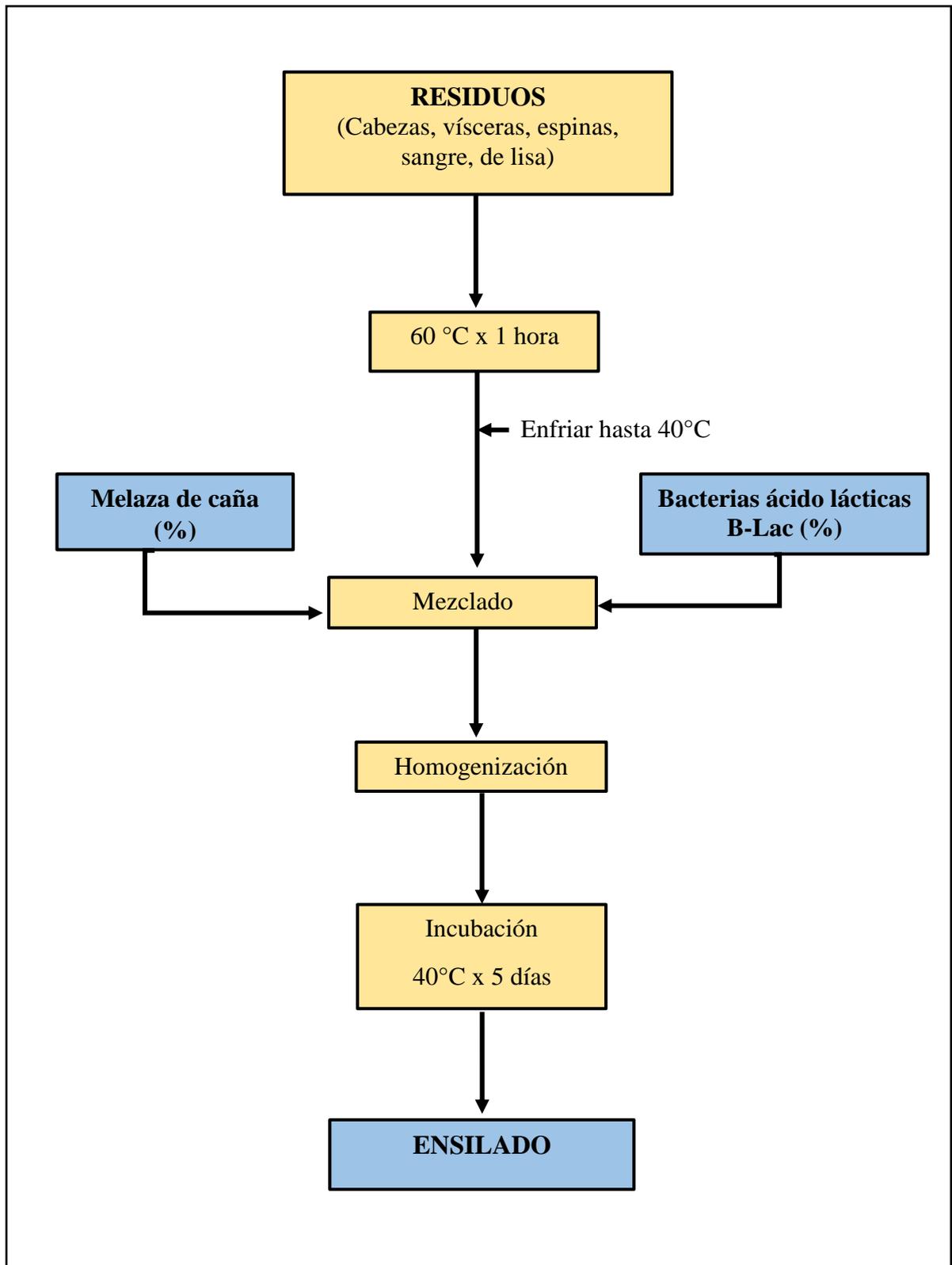


Figura 9: Flujograma experimental de la producción del ensilado de residuos de lisa para la segunda etapa

b) Caracterización del ensilado de residuos de lisa

Al ensilado líquido producido a escala piloto se realizaron los siguientes análisis:

- **Análisis Químico proximal:** Para determinar el contenido nutricional del ensilado de residuos de lisa (humedad, proteína total, grasa, carbohidratos y ceniza).
- **Análisis físico-químico:** pH, índice de acidez titulable, y el contenido de nutrientes (macro y micro) del ensilado de residuos de lisa con el fin de poder utilizarlo como fertilizante: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, cobre, zinc, manganeso y boro.
- **Análisis Microbiológico:** para evaluar si el ensilado de residuos lisa contiene microorganismos patógenos (coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, mohos y levaduras) y *Lactobacillus* sp.

El diagrama experimental de la primera y segunda etapa se presenta en la Figura 10.

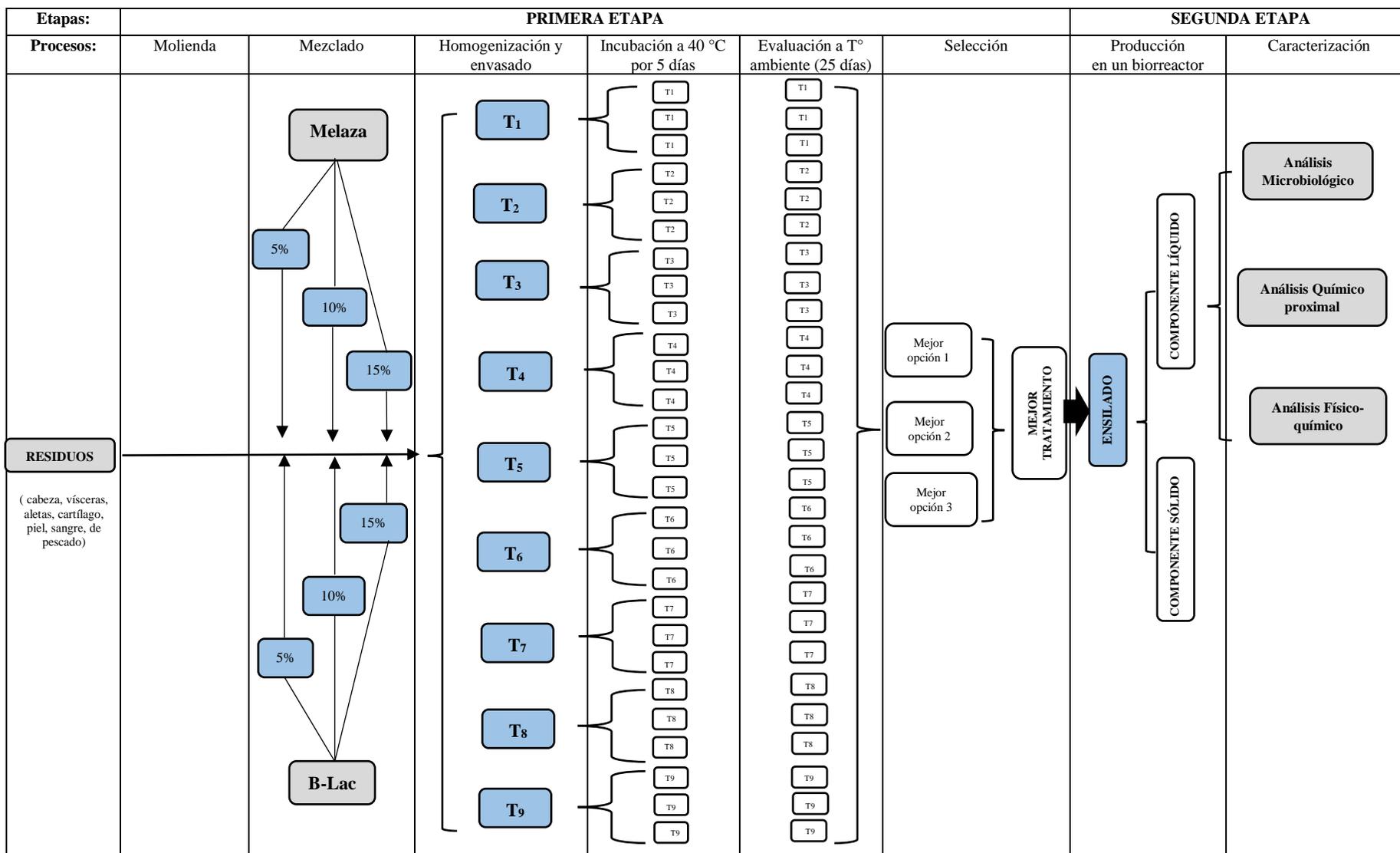


Figura 10: Diagrama experimental de la primera y segunda etapa

3.4.3 Tercera etapa

Acondicionamiento del ambiente

Durante la producción se limpió diariamente las mesas, paredes y estantería con hipoclorito de sodio al 0.5%. De igual manera, los pisos se trapeaban diariamente con hipoclorito de sodio diluido en agua. La mesa de cemento se limpiaba antes y después de los trabajos diarios con alcohol de 90°. La puerta y la parte externa de la tubería de aire se limpiaron con un paño humedecido con alcohol de 90°.

Limpieza y esterilización de materiales

El material de vidrio (pipetas, matraces, tubos de ensayo, etc.) fueron desinfectados con hipoclorito de sodio más agua en proporción 1:1, esta solución se sumerge todo el material de vidrio, previo enjuague con agua. Transcurrido como mínimo 6 horas, se enjuagó con abundante agua estéril cada recipiente, por 5 minutos. Se dejó escurrir, se cubrió con papel y se puso a esterilizar en autoclave a 121°C, 15 psi de presión por 20 minutos. De igual manera, los materiales de plástico (mangueras de conexión, conectores de plástico, etc.) se desinfectaron con hipoclorito de sodio más agua en proporción 1:1 y se enjuago con abundante agua estéril.

Agua marina

Para preparar los medios de cultivo se utilizó agua de mar a 20 ‰ filtrada al vacío con papel filtro de paso lento al vacío con ayuda de una bomba de 0,5 HP y un equipo Kitasato. Se utilizó un refractómetro marca ATAGO para verificar que se encuentre a esa proporción. El agua de mar fue esterilizada en matraces de 2 L de capacidad a 121°C, 15 psi de presión por 20 minutos y luego almacenada a temperatura de 16 ± 2 °C.

Aislamiento de la microalga *Tetraselmis suecica*

Se utilizó la cepa de *Tetraselmis suecica* proveniente del stock de inóculos mantenidos en el Laboratorio de Acuicultura, en el Área de Alimento vivo – UNALM.

En el aislamiento de la cepa se utilizó la técnica de rayado en placa de agar, este método brinda mayor facilidad para aislar algas de tamaño igual o menor a 10 μm de diámetro. También produce cultivos axénicos. Se preparó una solución nutritiva para microalgas con 1.5 % w/v de agar disuelto, se vertió de forma estéril a 3 placas Petri de 100 x 15 mm. Al cabo de 20 minutos se colocó dos gotas de la muestra de *T. suecica* cerca de la periferia en el medio solidificado. Con el asa de aislamiento (punta esterilizada sumergida en alcohol y quemada), se empezó a rayar en paralelo la muestra de la colección en el agar. Las placas fueron selladas con parafilm, se invirtieron y se colocaron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 18 a 20°C por 8 días.

Pasado este tiempo observar directamente en el microscopio el rayado y seleccionó las colonias deseadas que están libres de otros organismos. Se removió las colonias seleccionadas usando una pipeta Pasteur estéril y se colocó en una gota de medio de cultivo estéril sobre un cubreobjeto. En un microscopio compuesto se observó las unidades de microalgas deseadas. Se repitió el procedimiento de rayado de una sola zona, se constató y nuevamente se incubó para que se formen las colonias. Este segundo rayado redujo la contaminación por bacterias y así se aseguró agrupaciones de unidades de *T. suecica*. Luego, se transfirió las unidades algales de una colonia a tres tubos de ensayo que contenían 10 mL medio líquido (Medio Yashima), los tubos fueron sellados con parafilm y colocados en gradilla, los cuales se incubaron bajo iluminación a 18 a 20°C durante 5 días. En el cultivo en medio líquido se homogenizó diariamente, para evitar la sedimentación de la cepa. A partir de los tres tubos de ensayo se replicaron en 3 matraces de 250 mL con un volumen de 200 mL. Luego en matraces de 1L con un volumen de 800 mL, obteniéndose un cultivo iniciador con una densidad aproximada de 20×10^5 células/mL aproximadamente. Estos cultivos iniciadores se usaron como inóculo. El conteo de la población de la microalga *T. suecica* se realizó en una cámara de Neubauer bajo el microscopio, en el cual con la ayuda de una pipeta estéril se extrajo 1 mL de cultivo, se colocó dentro de un vial limpio, luego se fijó con una gota de ácido acético y se homogenizó con una pipeta Pasteur.

Varios autores recomiendan entre otros métodos el uso de antibióticos para eliminar otros microorganismos, pero la microalga *Tetraselmis suecica* tiene capacidad inhibitoria de bacterias patógenas por la producción de exudados, afectando a las comunidades bacterianas

asociadas al alimento vivo (Austin *et al.* 1992). Estas sustancias inhibidoras del crecimiento de patógenos inhiben el desarrollo de bacterias que no son inocuas en el cultivo (Rodríguez *et al.* 2007).

Proceso del cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*

En un matraz estéril de 1 L se filtró el ensilado puro con la ayuda de un embudo estéril y papel Whatman N°1. La solución resultante fue separada y conservada en refrigeración en un envase de vidrio con tapa a temperatura de 16 ± 2 °C.

Se utilizó 3 concentraciones de ensilado de residuos de lisa estéril/agua de mar (1/2000, 1/1500 y 1/1000) y un tratamiento control (agua de mar/medio Yashima). Se preparó cada uno de los medios de cultivo en matraces de 1 L de capacidad. La composición de los medios de cultivo se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7: Composición de los medios de cultivo para *Tetraselmis suecica*

Tratamiento	Composición del medio de cultivo
T1 (control)	1.0 mL de medio Yashima /L agua de mar estéril
T2 (1/2000)	0.5 mL de Ensilado/L agua de mar estéril.
T3 (1/1500)	0.7 mL de Ensilado/L agua de mar estéril.
T4 (1/1000)	1.0 mL de Ensilado/L agua de mar estéril.

Cada medio de cultivo fue dispensado en 3 matraces más pequeños de 250 ml de volumen. Por lo tanto, el sistema de cultivo estuvo conformado por 12 unidades experimentales, cuatro tratamientos y cada una con tres repeticiones, siguiendo la técnica de “*batch*”. A cada matraz se le adicionó 5 mL de inóculo (*Tetraselmis suecica*). Los medios de cultivo fueron agitados por burbujeo de aire constante (15 L/h) e iluminados de manera continua con luz fluorescente de 40 W a una temperatura de 20 ± 2 °C, que es la temperatura óptima del cultivo de *T. suecica*.

Determinación de la densidad poblacional

La densidad celular (células/mL), fue evaluada a diario siguiendo el método del hemocitómetro, para lo cual se tomó una muestra de cultivo de 1 mL, la cual fue colocada en cámara de Neubauer, fijándose con ácido acético, para evitar la movilidad de las células. El recuento se realizó con un microscopio óptico con aumento de 400x (Piña *et al.* 2007).

El diagrama experimental de la tercera etapa experimental se presenta en la Figura 11.

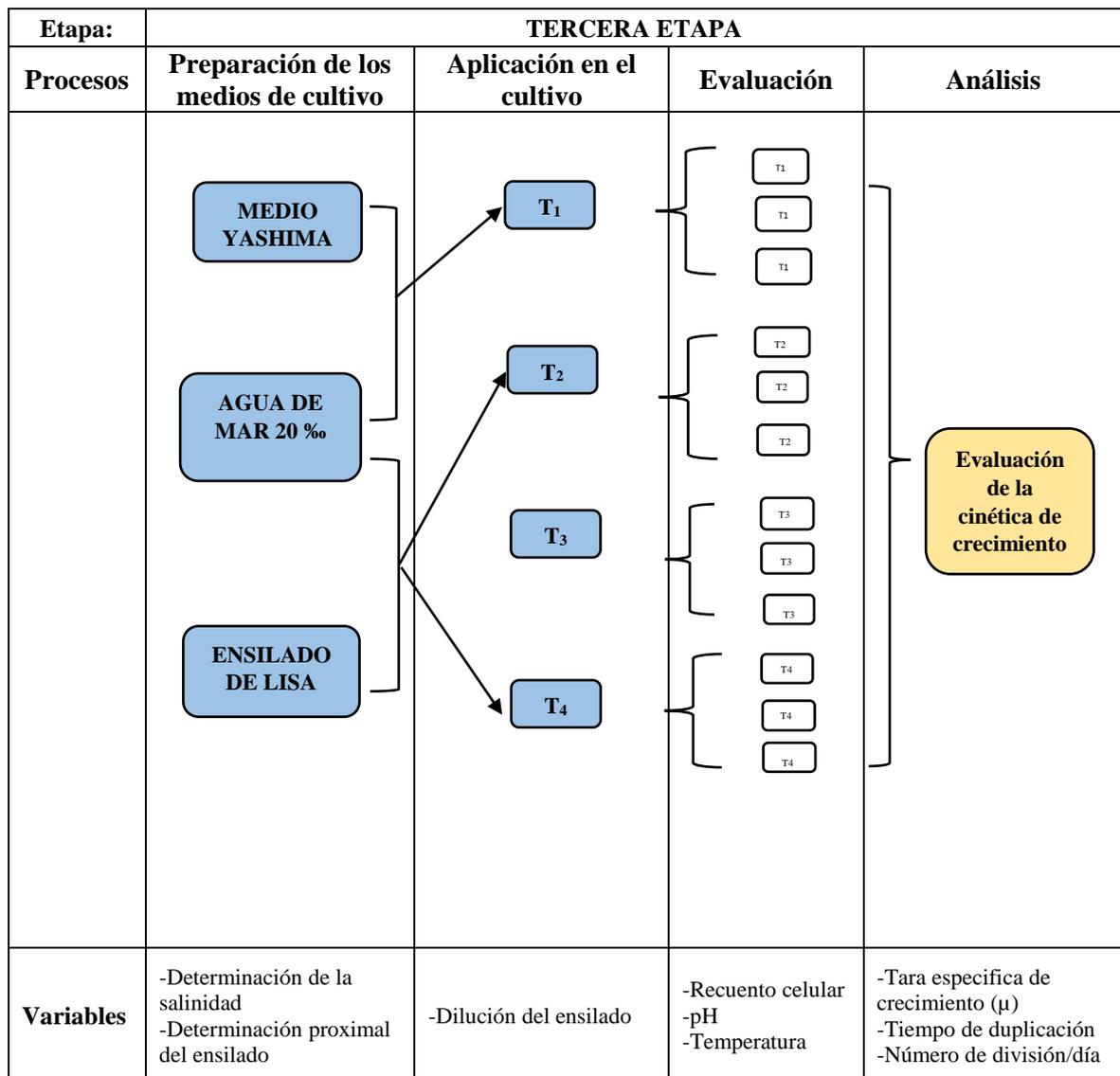


Figura 11: Diagrama experimental de la tercera etapa

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la primera etapa como método estadístico se utilizó un Diseño factorial bajo un DCA (Diseño Completamente al Azar) para dos casos. En un caso se tomó como variable respuesta el pH y en otro el porcentaje de acidez láctica (expresada en ácido láctico) para el quinto día. Los tratamientos se generaron al combinarse 3 niveles de B-Lac (5%, 10%, 15%) y 3 niveles de melaza de caña (5%, 10%, 15%) tomando como base fija la mezcla de residuos de lisa. Se utilizó un nivel de significación del 5% ($\alpha=0.05$). Previamente se comprobó los supuestos: homogeneidad de varianzas y normalidad de errores respectivamente. Luego se verificó si existe interacción o no entre los factores (melaza y B-Lac) y finalmente se evaluó el ANVA para determinar si existe al menos un tratamiento diferente a un nivel de significancia de 5 % y al observar la existencia de al menos un tratamiento distinto a los demás se realizó una prueba comparativa de medias Tukey y se eligió el tratamiento con el menor valor de pH al quinto día. El diseño estadístico para la fermentación homoláctica se presenta en la Tabla 6.

En la tercera etapa, para comparar el efecto de las diferentes diluciones del ensilado de residuos de lisa y el control (Medio Yashima) en el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*, se realizaron cuatro tratamientos con tres repeticiones (ver Tabla 7). Se realizó un análisis de varianza ($p<0.05$) para los parámetros poblacionales: densidad celular y tasa de crecimiento (μ) para un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para determinar diferencias significativas entre tratamientos, si el ANVA resultará significativo, se realizó una prueba comparativa de medias Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MATERIA PRIMA

Inicialmente se procedió a tomar una muestra representativa de la materia prima (residuos de lisa), para caracterizarla a nivel físico químico y microbiológico.

En la Tabla 8 se presenta el análisis microbiológico a los residuos de lisa, donde se observa *Lactobacillus* sp (96×10^2 UFC/g), coliformes totales ($>1 \times 10^2$ NMP/g), así como de mohos y levaduras (98×10 UFC/g), lo cual indica la buena calidad microbiológica de la materia prima para la formulación del ensilado. Tanto los microorganismos y las levaduras actúan como aceleradores de la fermentación (Ito 2006).

Algunos autores señalan a la microflora del tracto intestinal del pescado como un reflejo del medio ambiente y la ingesta (Huss 1998). Para pescado fresco y congelado los límites mínimo y máximo de *E. coli* son 10 y 10^2 UFC/g respectivamente y ausencia de *Salmonella* sp. en 25 g de muestra (DIGESA 2003).

Tabla 8: Resultados del análisis microbiológico de los residuos del fileteado de lisa

Parámetro	Resultado
Enumeración de coliformes totales (NMP/g)	$>11 \times 10^2$
Enumeración de coliformes fecales (NMP/g)	4
Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<3
Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	96×10^2
Recuento de Mohos y levaduras (UFC/g)	98×10
Detección de <i>Salmonella</i> sp. en 25 g	Ausencia

Nota: Los valores <3 significan ausencia.

FUENTE: Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” (2017).

En forma general se considera que el pescado recién capturado está libre de bacterias y solo en branquias, tracto intestinal y en el mucus superficial se encuentran microorganismos como aerobios reportando valores entre 10^3 y 10^7 UFC/g en el tracto intestinal y entre 10^2 y 10^6 UFC/cm² en la piel (Gram y Huss 1996).

Los resultados de la composición físico químico (en base seca) de los residuos de lisa es mostrado en la Tabla 9, donde se observa que presenta un pH ácido igual 5.81, valor cercano a los reportados por Morillo *et al.* (2005) en lisa (*Mugil curema*) y corvina (*Cynoscion acoupa*), en este valor de pH no se observa ningún signo de descomposición del pescado.

Tabla 9: Composición físico químico (base seca) de los residuos de lisa

	Parámetro	Resultado
	pH	5.81
	C.E. (dS/m)	14.8
Macronutrientes	C (%)	39.34
	N (%)	7.08
	P ₂ O ₅ (%)	3.29
	K ₂ O (%)	0.72
	CaO (%)	6.02
	MgO (%)	0.2
Micronutrientes	Na (%)	0.34
	Fe (ppm)	143
	Cu (ppm)	5
	Zn (ppm)	60
	Mn (ppm)	53
	B (ppm)	69
Metales pesados	Pb (ppm)	15.28
	Cd (ppm)	1.69
	Cr (ppm)	4.58

FUENTE: Laboratorio de Agua, Suelo, Plantas y Fertilizantes-UNALM (2017).

En la Tabla 9, se reporta una mayor concentración de carbono (39.34%), seguido de nitrógeno (7.08 %), CaO (6.02 %) y P₂O₅ (3.29%). Finalmente, se determinó la relación carbono-nitrógeno, el cual resultó 5.56 g/g que se interpreta como una materia de alta disponibilidad de nitrógeno (INIA 2004).

Yilmaz (2003) en el estudio de niveles de metales pesados (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb y Zn) en el tejido de *Mugil cephalus* y *Trachurus mediterraneus* de la bahía de Iskenderun, Turquía; indica que los rangos de concentraciones medias ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso húmedo) en *Mugil cephalus* son los siguientes: el rango de concentración de hierro fue 70.28, 149.77 y 382.51; el de cobre fue 1.45, 5.36 y 35.37, el de níquel fue 1.22, 2.72 y 7.35, la de cromo fue 1.46, 3.22 y 10.06, la del plomo fue 7.45, 37.39 y 62.33, y la del zinc fue 38.23, 100.56 y 281.51, en el músculo, la piel y las gónadas, respectivamente.

En general, la piel y las gónadas muestran concentraciones de metales más altas que los músculos (Yilmaz 2003). Los metales pesados se acumulan principalmente en tejidos metabólicamente activos. El tejido hepático es muy activo en la captación y almacenamiento de metales pesados (Dural *et al.* 2006).

En un estudio realizado por Dural *et al.* (2006), indica que los niveles de metales son generalmente más altos en *Mugil cephalus* que en otras especies. Esto puede estar relacionado con las diferencias en las necesidades ecológicas, la natación, los comportamientos y las actividades metabólicas entre diferentes especies de peces.

4.2 PRIMERA ETAPA

4.2.1 Determinación de las proporciones de melaza y B-Lac

En el primer día de fermentación láctica, en los tratamientos T₁ (5% melaza y 5% B-Lac), T₂ (5% melaza y 10% B-Lac) y T₃ (5% melaza y 15% B-Lac) se apreció una pequeña hinchazón de la bolsa plástica que cubría cada mezcla debido a la producción de gas. Papagianni (2012) reporta la generación de dióxido de carbono en bacterias homofermentativas debido a desviaciones hacia la ruta heteroláctica por limitaciones del

sustrato, presencia de oxígeno, altos niveles de pH y/o bajas temperaturas. Peña (2008) señala que la formación de gases puede deberse a la presencia de levaduras, los cuales se presentan en mayor cantidad en la melaza.

También se forma CO₂ por la reacción de la composición ósea de los residuos del pescado con el ácido láctico producto de la fermentación homoláctica (carbonato y fosfato de calcio).

En la Figura 12, se puede observar que al quinto día, los tratamientos T₇ (15% melaza y 5% B-Lac), T₈ (15% melaza y 10% B-Lac) y T₉ (15% melaza y 15% B-Lac) presentaron los niveles más bajos de pH, entre 4.17 ± 0.01 , 4.22 ± 0.01 y 4.28 ± 0.01 respectivamente, en comparación con los tratamientos T₁ (5% melaza y 5% B-Lac), T₂ (5% melaza y 10% B-Lac) y T₃ (5% melaza y 15% B-Lac) que presentaron valores altos, entre 5.60 ± 0.01 y 6.15 ± 0.01 (ver Anexo 2).

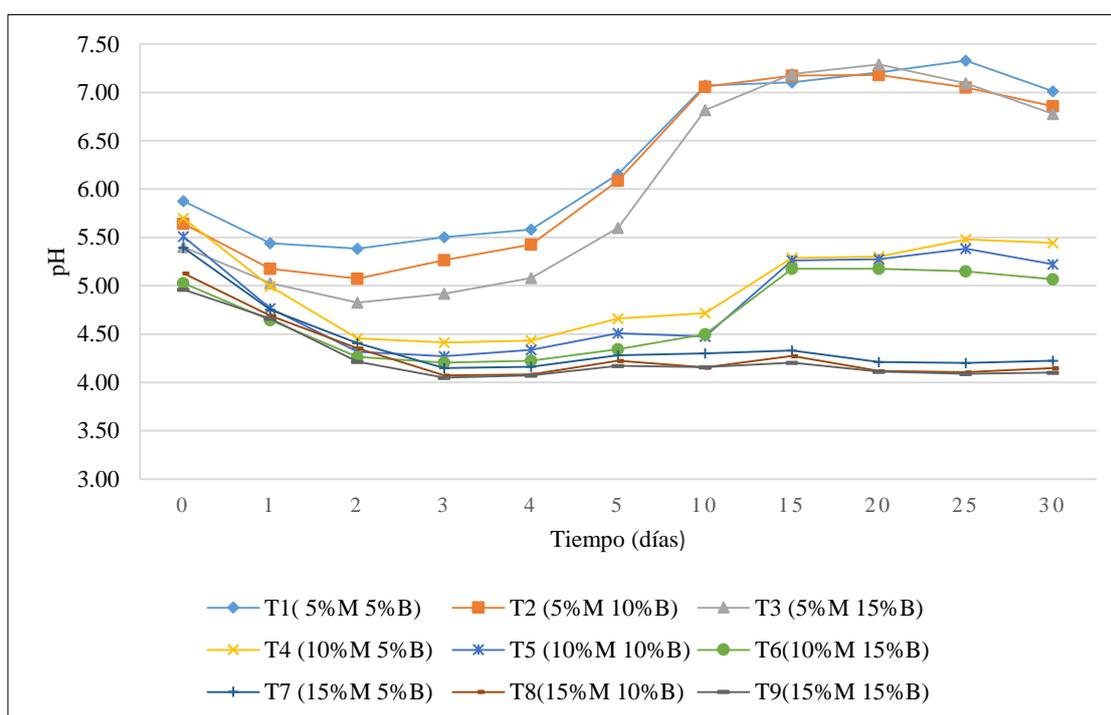


Figura 12: Niveles de pH de los diferentes tratamientos

Los ensilados preparados con 15 por ciento de melaza (T₇, T₈ y T₉) presenta una estabilidad en el pH los primeros cinco días, lo cual se mantienen hasta completar los 30 días de

almacenamiento a temperatura ambiente. En cambio en los tratamientos con 5 y 10 por ciento de melaza (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ y T₆) la estabilidad del pH se mantiene sólo los primeros 4 días, para luego incrementarse hasta valores por encima de 5, por lo cual se empieza a percibir olores desagradables, indicativo de cierta descomposición.

Según Bello *et al.* (1993), el pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. Varios autores señalan que valores de pH cercanos a 4.5 muestran el fenómeno de acidificación por parte de los microorganismos (Bello *et al.* 1993; Holguín *et al.* 2009; Spanopoulos *et al.* 2010).

En la Figura 13 se presenta una gráfica de comparación múltiple para el nivel de pH en el quinto día, donde se evidencia una relación indirecta entre el porcentaje de melaza y el nivel de pH, es decir los tratamientos que contengan mayor porcentaje de melaza en su composición, presentan los valores más bajos de pH.

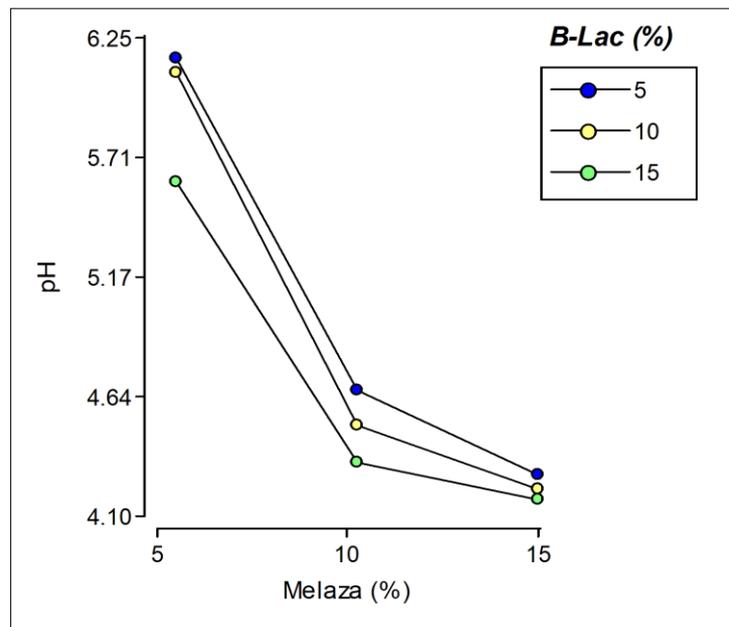


Figura 13: Comparación múltiple de los valores de pH.

A pesar de la inclusión de melaza en los tratamientos T₁, T₂ y T₃, los valores de pH muestran una tendencia al aumento durante el almacenamiento, lo cual puede ser motivado por el incremento de compuestos nitrogenados, que son producto del crecimiento de organismos distintos a los productores de ácidos lácticos y al no existir la cantidad suficiente de fuente de carbono para iniciar nuevamente la producción de ácido por parte de los microorganismos, no se puede reducir el pH a niveles de 4.5 y detener o controlar el crecimiento de las bacterias indeseables (Llanes *et al.* 2007). Referente a esto, Van Wyk y Heydenrych (1985) observaron una tendencia de disminución y luego de aumento del pH en el tiempo, recíproca al conteo de microorganismos ácidos lácticos durante el almacenamiento del ensilado biológico de pescado.

Berenz (1997) y Ahmed *et al.* (1996) señalan que la disminución de pH está relacionado directamente con el crecimiento de bacterias ácido lácticas presentes tanto en el inóculo como en las vísceras de pescado. Asimismo existe una relación directamente proporcional entre la concentración de ácido láctico y la concentración de H⁺ e inversa al pH. Es decir, ante un incremento del ácido láctico, los valores de pH disminuyen.

En la Figura 14, se observa el comportamiento de los valores de acidez láctica de los diferentes tratamientos en el tiempo.

Estudios efectuados sobre el proceso de fermentación láctica han demostrado que la formación de ácido láctico sobre el sustrato, genera un ambiente que inhibe el desarrollo de la mayoría de los microorganismos de putrefacción, debido a que el ácido láctico es un fuerte antagonista de las bacterias putrefactivas y patógenas. Además este efecto antagonista se debe a la formación de ácidos orgánicos no disociados producidos por la fermentación durante el proceso (Ramírez *et al.* 2011).

Bello *et al.* (1993) señalan que se obtienen mejores resultados en la producción de ácido láctico cuando se utiliza melaza como fuente de carbohidratos, ya que resulta ser efectivo como fuente de energía y minerales para el desarrollo de microorganismos fermentadores.

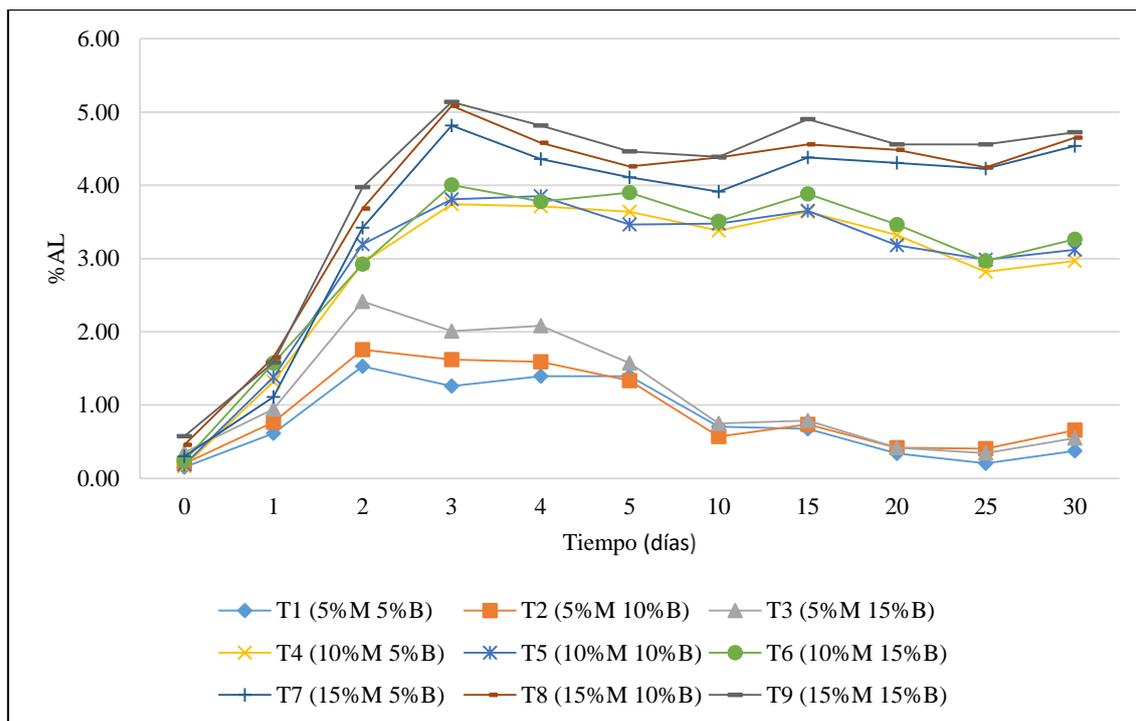


Figura 14: Porcentajes de ácido láctico de los diferentes tratamientos

Las cantidades de melaza empleadas para obtener un ensilado son variables. Berenz (1997) señala que se requiere como mínimo 10 por ciento de melaza y en otros trabajos han reportado el empleo de 15 por ciento de melaza obteniendo buenos resultados (Nwana 2003; Vidotti *et al.* 2003; González y Marín 2005; Toledo y Llanes 2006).

En la Figura 15 se presenta una gráfica de comparación múltiple para el porcentaje de ácido láctico en el quinto día, en donde se observa que la acidificación más alta se obtuvo en el tratamiento con 15 por ciento de melaza, entre $4.13 \pm 0.03\%$ y $4.46 \pm 0.03\%$. Mientras que los tratamientos con 5 por ciento de melaza presentaron los valores más bajos entre $1.34 \pm 0.03\%$ y $1.58 \pm 0.03\%$, al quinto día de fermentación (ver Anexo 4).

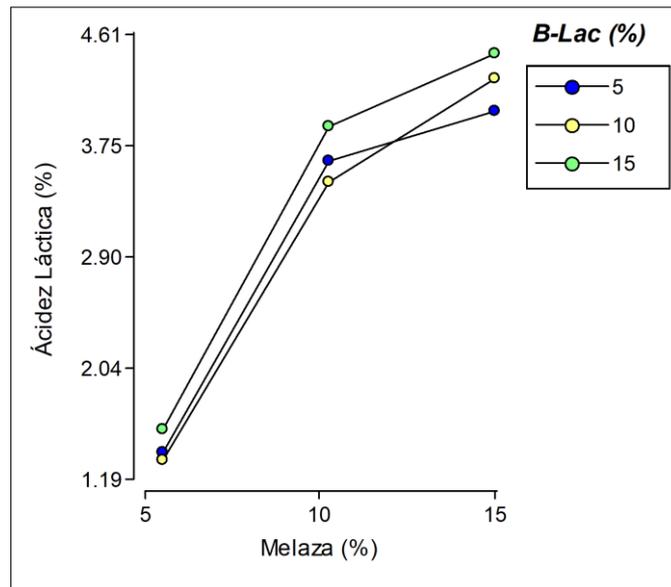


Figura 15: Comparación múltiple para el porcentaje de ácido láctico

Al respecto, González y Marín (2005), utilizaron los desechos del procesamiento de sardinas para la elaboración de un ensilado biológico, empleando 15 por ciento de melaza, 15 por ciento de inóculo de *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 y 0.25 % de ácido sórbico como agente anti-micótico; reportaron valores de pH de 4.5 y acidez láctica de 2.8 por ciento.

Vidotti *et al.* (2002) realizaron un fermentación láctica en residuos comerciales de peces marinos, usando como inóculo *Lactobacillus plantarum*, emplearon la proporción (p/p): 79.75 por ciento residuos pescado molido, 15 por ciento de melaza, 5 por ciento de *L. plantarum* (10^8 - 10^9 UFC / g) y ácido sórbico al 0.25 por ciento como fungicida, registrando valores de pH de 4.52 y 4.48 al quinto y treintavo día respectivamente.

De igual manera, Martínez (2003) en la fermentación láctica de vísceras de pescado de las especies *Prochilodus mariae* (coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (bagre rayado) y *Phractocephalus hemiliopterus*, empleando 15 por ciento de melaza y 5 por ciento de inóculo, reportan valores de pH en un rango de 4.31 y 4.68 al sexto día de fermentación.

4.2.2 Selección del mejor tratamiento

Para elegir cuál de estos tratamientos es el mejor para la producción en el biorreactor, se escogieron los mejores tratamientos mediante la prueba de comparación múltiple Tukey aplicada en el quinto día. Esta prueba indicó que con los tratamientos compuestos por 15 por ciento de melaza (T₇, T₈ y T₉) obtuvieron los niveles más bajos de pH, cuyos valores fueron 4.28 ± 0.01 , 4.22 ± 0.01 y 4.17 ± 0.01 respectivamente, y que no existen diferencias estadísticamente significativas entre T₈ y T₉, pero sí entre T₇ (ver Anexo 2).

De igual manera se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey para el porcentaje de ácido láctico, el análisis estadístico determinó que los tratamientos con 15 por ciento de melaza presentan los porcentajes más altos de acidez láctica, además que existieron diferencias estadísticas entre T₇ con respecto a T₈ y T₉. No se encontraron diferencias estadísticas al comparar T₈ y T₉. Los valores fueron $4.13 \pm 0.03\%$ para T₇, $4.28 \pm 0.03\%$ para T₈ y $4.46 \pm 0.03\%$ para T₉ (ver Anexo 4).

Para la evaluación física y sensorial de los mejores tratamientos se empleó las tablas de calidad de los ensilados propuesta por Bertullo (1989) citado por Spanopoulos *et al.* (2010) (ver Tabla 10).

En la Tabla 11 se presentan las características físicas de los ensilados al cabo de los 5 días de fermentación, donde se observa que el color de los ensilados es más oscuro (marrón) teniendo en cuenta los porcentajes de melaza empleada en cada tratamiento. El olor indicó que los ensilados son similares y agradables, sin ningún indicio de proceso de descomposición. Según Sastro *et al.* (2013) el olor y color del ensilado es influenciada por el contenido de la fuente de carbono. Otro indicador es la consistencia, el cual es pastosa en el T₇ con poco líquido porque a pesar de que se observó presencia de líquido, la cantidad no es suficiente para darle consistencia pastosa-líquida, lo que sucedió en el T₈ y T₉. Estos resultados coincide con los resultados alcanzados por Holguín *et al.* (2009) al referirse que los ensilados, elaborados con 15 por ciento de melaza y un inóculo bacteriano de 1 por ciento, mantuvieron un aroma agradable y una consistencia blanda hasta el final del almacenamiento.

Tabla 10: Evaluación física de la calidad de los ensilados

Atributo	Bueno	Regular	Inaceptable
Olor	Ácido suave	Picante penetrante	Pútrido rechazable
Color	Amarronado Grisáceo claro	Amarronado o grisáceo claro-oscuro	Gris oscuro negruzco
Consistencia	Líquida	Líquido pastoso ó licuado	Pastoso

FUENTE: Bertullo (1989).

Tabla 11: Evaluación sensorial de la calidad de los mejores tratamientos

Tratamiento	Olor	Color	Consistencia
T ₇	Suave olor a aceite de pescado	Marrón claro (canela)	Pastosa con poco líquido en la base.
T ₈	Suave olor a aceite de pescado	Marrón oscuro	Pastosa-líquida
T ₉	Olor a aceite de pescado	Marrón oscuro	Pastosa-líquida

Después de evaluar los resultados bajo diversos parámetros se concluyó que los ensilados elaborados con 15 por ciento de melaza combinados con cualquiera de los porcentajes de B-Lac se obtienen buenos resultados tanto en pH como acidez láctica. Este resultado es corroborado por García (2008) y Holguín *et al.* (2009) que indican que los ensilados de pescado preparados con esta proporción de melaza se obtienen los valores de pH más bajos y son más estables en el tiempo.

Debido a que la diferencia entre los tratamientos (T₇, T₈ y T₉) se basa en la proporción de los insumos, más específicamente en la proporción de B-Lac, se tuvo como criterio de selección final el tratamiento que contenga un mayor aprovechamiento de los residuos de lisa, por lo tanto, se eligió el tratamiento T₇.

4.3 SEGUNDA ETAPA

4.3.1 Producción del ensilado a escala piloto

El tratamiento elegido en la etapa laboratorio fue el T₇, cuya composición es 15 por ciento (p/p) de melaza y 5 por ciento (p/p) de B-Lac. A los 16 kg de residuos de lisa se le adicionaron 2.4 kg de melaza y 0.8 kg de B-Lac, logrando obtener 19.2 kg de ensilado (ver Tabla 12).

Tabla 12: Composición del ensilado producido a escala piloto

Ingredientes	Ensilado
Residuos del fileteado de lisa (kg)	16
Melaza (kg)	2.4
B-Lac (kg)	0.8
Total (kg)	19.2

Todos los ingredientes para la elaboración del ensilado se mezclaron en un biorreactor de acero inoxidable de capacidad de 40 L, a temperatura de 60°C por una hora, para acelerar la hidrólisis proteica y eliminar los microorganismos de los residuos del pescado. Luego se procedió a generar las condiciones anaeróbicas e incubación por cinco días a 40°C para fomentar el crecimiento de las BAL. Terminado el tiempo de incubación se procedió a separar las partes duras que no se hidrolizaron como los huesos y las espinas. Los sólidos separados fueron pesados y se calculó el porcentaje de los residuos no hidrolizados. Se midió el volumen de la parte líquida y se calculó la relación: ensilado líquido/ residuo inicial de pescado. Los resultados de la medición de los componentes del ensilado de residuos de lisa se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13: Medición de los componentes del ensilado de lisa

Parámetro	Promedio
Residuos del fileteado de lisa (kg)	16 kg
Ensilado líquido (L)	17.75 L
Residuos no hidrolizados (kg)	3.14
Ensilado líquido/residuo inicial	1.11
Porcentaje de residuos no hidrolizados (%)	19.63

Como se aprecia en la Tabla 13, el ensilado líquido es 1.11 veces mayor que el residuo de fileteado de lisa utilizado. Esta relación es muy útil para calcular cuánto ensilado líquido se puede obtener a partir de una determinada cantidad de residuos de pescado. Si se trabaja con 100 kg de residuos de lisa se puede producir alrededor de 111 L de ensilado líquido. A pesar de que las enzimas proteolíticas del pescado hidrolizan las proteínas de los residuos, no pueden hacer lo mismo con los huesos, las espinas y algunos componentes duros del pescado (García 2008).

También se evaluaron los valores de pH y porcentaje de acidez láctica durante los cinco días de fermentación. En la Figura 16, se realiza la comparación de los valores de pH y acidez titulable (%) del ensilado producido en el biorreactor y elaborado a escala laboratorio.

En la Figura 16 se observa una correspondencia entre los ascensos y descensos tanto en los valores de pH y porcentajes de acidez láctica del ensilado elaborado a escala laboratorio y el piloto. En este último, los resultados de pH disminuyeron desde 5.43 en el día 0 hasta 4.35 en el día 5, esta misma tendencia se observa en los resultados de la primera etapa que descendieron desde 5.39 hasta 4.28. En los resultados de ácido láctico también se observó un aumento de 0.31 a 4.25 por ciento, valores cercanos a los obtenidos en la etapa laboratorio.

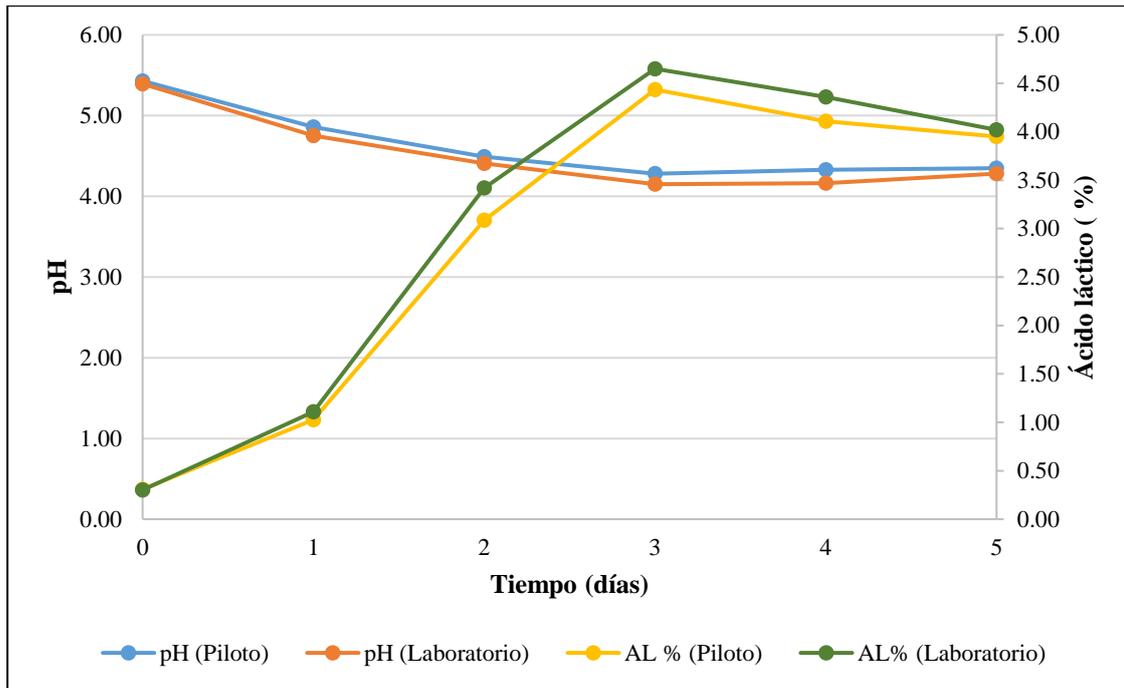


Figura 16: Comparación de los niveles de pH y porcentaje de acidez láctica de los ensilados elaborados a escala laboratorio y piloto

En la Figura 16 se observa una correspondencia entre los ascensos y descensos tanto en los valores de pH y porcentajes de acidez láctica del ensilado elaborado a escala laboratorio y el piloto. En este último, los resultados de pH disminuyeron desde 5.43 en el día 0 hasta 4.35 en el día 5, esta misma tendencia se observa en los resultados de la primera etapa que descendieron desde 5.39 hasta 4.28. En los resultados de ácido láctico también se observó un aumento de 0.31 a 4.25 por ciento, valores cercanos a los obtenidos en la etapa laboratorio. Esta misma tendencia se observa en la investigación de García (2008) quien utilizó pejerrey eviscerado fresco, el cual no fue hervido ni molido, en la elaboración de un ensilado biológico con 5 por ciento de melaza y 15 por ciento de inóculo (B-Lac) obteniendo como resultado un pH de 4.20 en el cuarto día de fermentación a 40 °C.

Los valores de pH obtenidos en el ensilado son satisfactorios para su conservación, a pesar que los residuos de lisa no recibieron ningún tratamiento físico o químico previo, tal como la trituración, congelación, acidificación, hidrólisis o cocción, los resultados se encuentran dentro de los rangos de valores reportados para alcanzar una buena estabilidad en el producto (Bello *et al.* 1993;González y Marín 2005; Llanes *et al.* 2007; Holguín *et al.* 2009).

4.3.2 Caracterización del ensilado líquido de residuos de lisa

a) Análisis físico químico del ensilado líquido de lisa.

Los resultados de la composición físico química del ensilado de residuos de lisa es mostrada en la Tabla 14.

En la Tabla 14, se observa que el valor de pH del ensilado fue de 4.57, según Spanopoulos *et al.* (2010), los ensilados biológicos que presentan valores de pH superiores a 4.1, representan una ventaja en la formulación de dietas para la alimentación animal y como uso de fertilizante, pues no requieren neutralizarse tanto antes de su utilización, como sucede con los ensilados químicos que alcanzan valores de pH alrededor de 3.

Ito (2006) sostiene que cuando el pH permanece cerca de 4.2, la fermentación tiende a estabilizar la solubilidad de los elementos nutricionales, permitiendo una mejor disponibilidad de nutrientes. De manera similar, Molina *et al.* (1993) señala que el pH influye en la solubilidad de los productos y la disponibilidad de nutrientes para ser absorbidos, y que con valores de pH ligeramente ácidos hay una mayor disponibilidad de elementos como N, P, S, Cu, Zn y Fe; mientras que cuando las condiciones son básicas, los precipitados son difíciles de absorber.

Los valores de conductividad eléctrica (CE) y sólidos totales, fueron de 20.57 dS/m y 386.36 g/L respectivamente. La CE de una solución está directamente relacionada con el total de sólidos disueltos en forma de iones; cuanto más alto es el valor de los mismos mayor es la CE de dicha solución (Molina *et al.* 1993). Entonces, se puede decir que un valor bajo de pH propicia una mayor cantidad de sólidos disueltos en forma de iones, es decir, una mayor cantidad de nutrimentos en el fertilizante, además de una mayor solubilidad, todo lo cual se ve reflejado en valores de CE altos (Ito 2006).

Según la Tabla 14, los principales macronutrientes son, el nitrógeno (18592 mg/L), el potasio (8800 mg/L) y el fósforo (1680.08 mg/L). En los micronutrientes destaca el sodio (154 mg/L) y el hierro (65.25 mg/L). La concentración de fósforo es relativamente baja a

comparación con los demás macronutrientes, esto podría deberse a que la mayor concentración de fósforo se encuentra como fosfato de calcio en los huesos, los cuales fueron separados del ensilado líquido, siendo considerados como residuos no hidrolizados.

Tabla 14: Composición físico-químico del ensilado líquido de residuos de lisa

	Parámetro	Resultado
	pH	4.57
	C.E. (dS/m)	20.7
	Sólidos Totales (g/L)	386.36
	M.O. en solución (g/L)	348.28
Macronutrientes	N total (mg/L)	18592
	P total (mg/L)	1680.08
	K total (mg/L)	8800
	Ca total (mg/L)	2935
	Mg total (mg/L)	730
Micronutrientes	Na total (mg/L)	154
	Fe total (mg/L)	65.25
	Cu total (mg/L)	2.45
	Zn total (mg/L)	4.1
	Mn total (mg/L)	1.6
	B total (mg/L)	3.3
Metales pesados	Pb (mg/L)	15.28
	Cd (mg/L)	1.69
	Cr (mg/L)	4.58

FUENTE: Laboratorio de Agua, Suelo, Plantas y Fertilizantes-UNALM (2017).

Caso similar se observa en el biofertilizante de hidrolizados de residuos pescado producido por Bossio (2007) cuya concentración de fósforo fue de 310 mg/L, en donde en el proceso para elaborar el ensilado, los huesos fueron separados del hidrolizado puesto que estos no pudieron ser degradados, y con el objetivo de emplearlo como fertilizante se agregó roca fosfatada.

El contenido mineral de un fertilizante no es suficiente para determinar su calidad, es necesario tener en cuenta otros factores. La relación C/N juega un papel importante en la mineralización del N y puede ser usado como un parámetro de calidad del fertilizante en la contribución real del nitrógeno (INIA 2004). De acuerdo con Leblanc *et al.* (2007), si la relación C/N de un fertilizante es menor a 20, es fácilmente degradable, inicialmente inmovilizado por microbios cuando mueren, que son liberados al medio ambiente. Además, la relación C/N es un importante requerimiento de los microorganismos que usan carbono como fuente de energía y nitrógeno como elemento básico para la formación de proteínas y otros constituyentes del protoplasma celular. El valor de la relación C/N del ensilado de residuos de lisa se calculó mediante el porcentaje de materia orgánica y el factor 1.724 (Thompson y Troeh 1988), resultando 10.866 g/g. el cual se interpreta que tiene alta disponibilidad de nitrógeno (INIA 2004).

Para comprender mejor el potencial del ensilado de residuos de lisa como fertilizante se comparó su composición físico químico con la de otros fertilizantes orgánicos elaborados a base de residuos de pescado (ver Tabla 14).

Según se observa en la Tabla 14, el ensilado presenta una concentración mayor de potasio que los otros fertilizantes, al igual que una concentración elevada de nitrógeno, sólo superado por García (2008).

El ensilado de residuos de lisa, obtuvo concentraciones mayores de nitrógeno y potasio que los reportados por Bossio (2007), Kim *et al.* (2010), y Aranganathan y Rajasree (2016). El contenido de fósforo fue el más bajo siendo superados por la mayoría, a excepción de Bossio (2007) cuyo valor fue de 310 mg/L.

Tabla 15: Análisis físico químico de fertilizantes elaborados a partir de residuos de pescado

Parámetro	Biofertilizante basado en residuos de pescado ⁽¹⁾	Ensilado de residuos de pescado ⁽²⁾	Fertilizante líquido de residuos de pescado ⁽³⁾	Fertilizante líquido de subproductos de pescado ⁽⁴⁾	Ensilado de residuos de lisa ⁽⁵⁾
N total (mg/L)	9485	20000	15700	10000	18592
P total (mg/L)	310	3600	3100	3900	1680.08
K total (mg/L)	3296	7800	4500	3700	8800
Ca total (mg/L)	1672	7300	---	1400	2935
Mg total (mg/L)	696	1300	---	5200	730
Na total (mg/L)	1072	2100	---	---	154
Fe (mg/L)	30	41.1	---	50.51	65.25
Cu (mg/L)	2.25	3.3	---	0.61	2.45
Zn (mg/L)	4.2	4.9	1.72	5.66	4.1
Mn (mg/L)	2.4	1.78	---	2.81	1.6
B (mg/L)	21	9.05	---	---	3.3
M.O. en solución (g/L)	148.42	210600	---	---	348.28
pH	3.6	4.35		4.2	4.57

Nota: (1) Biofertilizante de residuos hidrolizados de pescado (Bossio, 2007). (2) Ensilado de residuos de pescado sin hidrolizar (García, 2008). (3) Fertilizante líquido a partir de caldo fermentado de residuos de pescado (Kim *et al.* 2010). (4) Fertilizante líquido de subproductos de pescado de la familia Clupeidae (Aranganathan y Rajasree 2016) (5) Ensilado de residuos de lisa.

En la India, Aranganathan y Rajasree (2016) convirtieron residuos de pescado denominados “MTF” (Marine trash fish) en un fertilizante líquido orgánico utilizando 10 por ciento de melaza y cepas de *Bacillus subtilis* para la gestión efectiva de desechos sólidos. Probaron su eficacia en el crecimiento de plantas de tomate, concluyendo que las plantas tratadas con fertilizante orgánico mostraron una buena respuesta de crecimiento en comparación con un fertilizante químico. De igual manera, en Corea del sur, Kim *et al.* (2010) demostraron el potencial de conversión de desechos de pescado provenientes de restaurantes especializados en comida marina, en fertilizantes líquidos utilizando bacterias proteolíticas, obteniendo una baja fitotoxicidad en una prueba de germinación de semillas de mastuerzo (*Lepidium sativum*) y una baja concentración de metales pesados.

Análisis de metales pesados

El Real Decreto 506/2013 de España señala que los productos fertilizantes elaborados con materias primas de origen animal o vegetal no deben exceder los Límites Máximos Permitidos (LMP) de metales pesados que son presentados en la Tabla 16.

Tabla 16: Límite máximo de metales pesados

Metales pesados	Límites de concentración Líquidos (mg/kg)			Ensilado de residuos de lisa (mg/kg)
	Clase A ¹	Clase B ²	Clase C ³	
Pb	45	150	200	15.28
Cd	0.7	2	3	1.69
Cr	70	250	300	4.58

Nota: ¹Clase A: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna A. ²Clase B: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna B. ³Clase C: Productos fertilizantes cuyo contenido en metales pesados no superan ninguno de ellos los valores de la columna C.

De acuerdo a la Tabla 16, los valores de Pb, Cd y Cr del ensilado se encuentran por debajo de los LMP del Real Decreto Español, y se encuentra en la posición de fertilizante orgánico de clase B.

Según Cordero *et al.* (2005) en un estudio sobre los efectos de metales pesados en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae), señala que los cultivos expuestos a concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/L de Cd y Cu, a las 24 horas, no se observa disminución de la densidad algal.

Este comportamiento, puede estar relacionado con la utilización del Cu como micronutriente (Rodríguez y Rivera 1995). En el caso del Cd, aunque este metal no ha sido establecido como micronutriente, estudios recientes (Sunda y Huntsman 2000) han considerado que puede actuar como tal cuando se encuentra en concentraciones trazas y existe limitación de algunos micronutriente esenciales. Estos resultados, con respecto al Cd, son acordes con Romero *et al.* (2002), quien en un estudio realizado con *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. encontró que la disminución del crecimiento poblacional de estas microalgas ante el Cd se manifiesta a partir de concentraciones superiores a 4.0 mg/L.

Se observó más adelante que no hubo una disminución significativa en el cultivo de las microalgas en los tratamientos expuestos a los metales presentes en el ensilado debido a que estos se encontraban a concentraciones menores de 5 mg/L y son empleadas por las microalgas como micronutrientes.

b) Composición química proximal del ensilado líquido de lisa

En la Tabla 17 se presentan los resultados del análisis proximal del ensilado líquido de residuos de lisa. Se encontró que el valor de la humedad es cercano a los obtenidos por González y Marín (2005) en el ensilado elaborado a partir de los desechos del procesamiento de la sardina (68.4 ± 0.15 %), Spanopoulos *et al.* (2010) en el ensilado de tilapia (66.77%), y al reportado por Fagbenro y Bello-Olusoji (1997) quienes obtuvieron un valor de humedad del 70% en el ensilado de cabezas de camarón al igual que el reportado por García (2008) en el ensilado de residuos de pescado.

El valor de la proteína en el ensilado de residuo de lisa (en base humedad) fue similar al obtenido por García (2008) y el de González y Marín (2005) con un valor de 13 por ciento, pero fue considerablemente menor que el reportado por la FAO (2003), para el ensilado de residuos de pescado (69.9%), sin embargo el reporte fue en base seca, lo mismo para lípidos y cenizas que reporta valores de 12.2 y 10.5 por ciento respectivamente. Adicionalmente, Padilla (1996) señala que cuanto mayor sea el contenido de agua en el ensilado menor será la concentración de nutrientes, como proteínas y lípidos.

El contenido de grasa del ensilado es de 12 por ciento en base húmeda, mientras que algunos trabajos han reportado valores cercanos al 5 por ciento en ensilados elaborados con residuos de sardinas (González y Marín 2005); esto hace pensar que el valor registrado en este estudio es alto. Así mismo, este es un factor importante desde el punto de vista energético y de nutrición para los animales, por lo cual se debe tener en cuenta al formular las dietas para estos, puesto que niveles excesivos de grasa pueden dar lugar al desarrollo de aromas de pescado indeseables en la carne de cerdo y pollo, pero no es un problema para alimentar otro tipo de animales, por ejemplo peces (Holguín *et al.* 2009).

Vidotti *et al.* (2002) utilizando residuos de la comercialización de peces marinos, peces de agua dulce y desechos del fileteado de Tilapia, encontraron diferencias en los valores de proteína, extracto etéreo, y cenizas. Estas diferencias observadas en la composición química de los ensilados están atribuidas a la materia prima, ya que la composición de los residuos de pescado puede variar con la especie, época de captura, estado reproductivo e inclusive de acuerdo al tipo de corte (Spanopoulos *et al.* 2010).

Tabla 17: Composición proximal (base húmeda) del ensilado de residuos de lisa

Análisis	Resultados por cada 100 g
Humedad	60.9 g
Proteína	13 g
Grasa	12 g
Cenizas	3.8 g
Hidratos de carbono	10.3 g
Valor energético	201.2 Kcal

FUENTE: Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria-CNTA (2017).

En el ensilado de residuos de lisa, el valor de hidratos de carbono presentó un valor superior al reportado por Holguín *et al.* (2009) pero menor al reportado por García (2008) llegando a un valor del 10 por ciento. Según Vidotti *et al.* (2002) y Ramírez *et al.* (2008), al agregar melaza a los desechos de pescado para dar inicio al proceso de fermentación, este tiende a aumentar su concentración en carbohidratos.

Existe una correlación entre el pH y el nitrógeno no proteico, ya que a medida que disminuye el pH, se favorece la actividad proteolítica de ciertas enzimas, las cuales actúan sobre las proteínas del tejido muscular del pescado produciendo la hidrólisis. A medida que transcurre el tiempo (días), el ensilado se va tornando más líquido. Lo que está estrictamente relacionado con el proceso de solubilización de las proteínas y el proceso de licuefacción, consecuentemente a la par del mismo, el nitrógeno comienza a ser soluble (Bello *et al.* 1990; Bello *et al.* 1993).

Basándose en los resultados obtenidos, se puede señalar que el ensilado producido a partir de los residuos de lisa, presenta porcentajes aceptables de proteína, grasa, ceniza y carbohidratos, que hacen de este producto una fuente proteica y energética factible de utilizar en alimentación de microalgas.

c) Análisis microbiológico y evaluación de inocuidad del ensilado de residuos de lisa

Para utilizar el ensilado líquido como fertilizante orgánico para el cultivo de microalgas se hace necesario controlar el nivel microbiológico del producto final, principalmente para comprobar si están presentes organismo patógenos como coliformes y *Salmonella* sp. Los recuentos microbiológicos del ensilado líquido de residuos de lisa se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Análisis microbiológico del ensilado líquido de lisa

Parámetro	Resultado
Enumeración de coliformes totales (NMP/mL)	4
Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL)	<3
Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	<3
Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/mL)	24x10 ⁵
Recuento de Mohos y levaduras (UFC/mL)	<10
Detección de <i>Salmonella</i> sp. en 25 mL	Ausencia

Nota: Los valores <3 significan ausencia.

FUENTE: Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” (2017).

Los valores microbiológicos obtenidos en el ensilado ponen en manifiesto que los microorganismos patógenos son inhibidos principalmente por la condición de acidez del ensilado generada por las bacterias ácido lácticas. Estos resultados son similares a los obtenidos por García (2008) en la evaluación de la inocuidad del ensilado biológico de pescado.

La disminución del pH y la alta acidez favorece el desarrollo de los microorganismos ácido-lácticos lo que se puede constatar por la disminución general de los coliformes y la ausencia de *Salmonella* sp. (Spanopoulos-Hernandez *et al.* 2010).

Algunos autores señalan que la adición de ácido sórbico (al 0.25%) es de gran ayuda para prevenir la contaminación del producto fermentado por levaduras que asimilan el ácido láctico (Lindgren y Pleje 1983; González y Marín 2005; Spanopoulos *et al.* 2010).

Respecto al recuento de *Lactobacillus* sp., se registró un aumento de microorganismo acidúricos desde los presentes en los residuos de lisa (96×10^2 UFC/g) hasta la formación del ensilado (24×10^5 UFC/mL). Este comportamiento es debido principalmente a la disminución del pH, alta acidez, la incorporación del inóculo (B-Lac), condiciones anaeróbicas y la presencia de compuestos antibacterianos producidos por las bacterias ácido lácticas.

Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas son el principal mecanismo de antagonismo microbiano (Vásquez *et al.* 2009). No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Özcelik *et al.* 2016).

Bello (1994) y Huss (1997) consideran aceptables valores por debajo de 5×10^5 UFC/g de coliformes y ausencia de *Salmonella* sp. en 25 g de producto para la elaboración de dietas para animales.

Según el Real Decreto 506/2013 de España para los productos fertilizantes de origen orgánico, el límite máximo permisible de microorganismos no debe superar los siguientes niveles presentados en la Tabla 19.

Tabla 19: Límite máximo de microorganismos en productos fertilizantes de origen orgánico

Análisis	Límite	Ensilado
Salmonella en 25 g	0	Ausencia
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	< 1000	<3

Nota: <3 significan ausencia

La estabilidad del ensilado está corroborada por los valores microbiológicos que se muestran en la Tabla 18, donde se observa que la carga bacteriana está por debajo de los límites permisibles para la alimentación animal según comentarios de Bello (1994). También Huss (1997), cita que los valores establecidos para subproductos marinos tienen un límite de 5×10^5 UFC/g de coliformes fecales y de muestra.

Por lo que estos resultados permiten considerar al ensilado de residuos de lisa como materia prima aceptable para emplearse en dietas de animales acuáticos y como fertilizante en cultivos de microalgas (Sánchez *et al.* 2008).

4.4 TERCERA ETAPA

4.4.1 Evaluación del ensilado como fertilizante orgánico para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*.

Con los resultados del análisis físico químico del ensilado de residuos de lisa se pudo formular las razones N/P requeridos para el cultivo de microalga y el valor de pH de cada tratamiento (ver Tabla 20), los cuales se encuentran dentro del rango óptimo de crecimiento (16-24/1) (Corsini y Karydis 1990). Por otro lado el pH ácido (4.57) y la alta conductividad eléctrica (20.7 dS/m) del ensilado hacen imposible emplearlo directamente como medio de cultivo, por lo que se hace necesario que sea diluido con agua de mar (Sánchez *et al.* 2008). Se utilizó 3 concentraciones de ensilado/agua de mar (1/2000, 1/1500 y 1/1000).

Rodríguez *et al.* (2007) indica que al aplicar diluciones altas de ensilado, el cultivo de microalgas desarrolla pero no eficientemente, esto se explicaría porque en una concentración alta de nutrientes, pueden ocurrir una represión catabólica, pues a concentraciones de amonio mayores a 0.5 moles/L, las algas dejan de asimilar nitrógeno en forma de nitrógeno o urea (Darley 1987).

Se cultivó *Tetraselmis suecica* en lote (*batch*) durante 8 días, tiempo en el cual todos los tratamientos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento (ver Figura 16). La temperatura se mantuvo en un rango de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, la iluminación fue constante durante todo el día,

suministrada por 2 tubos fluorescentes de 40 watts (aproximadamente 1000 lux) y la aireación fue de 0.5 vvm (15 L/h). El pH se verificó diariamente con un pHmetro digital que se mantuviera dentro del rango óptimo de crecimiento de (pH 7.0-9.0). Los valores de densidades en los diferentes medios de cultivo se presentan en la Tabla 21.

Tabla 20: Características de los tratamientos utilizando el ensilado de residuos de lisa

	Ensilado		
	1/2000	1/1500	1/1000
N/P	24.501	24.528	24.502
pH	7.65	7.5	7.36
CE (dS/m)	2.44	2.67	2.78

En la Tabla 21 se puede apreciar que los tratamientos con diferentes diluciones de ensilado presentaron mayores concentraciones (células/mL), donde el T₄ obtuvo el valor más alto, $85.69 \pm 1.34 \times 10^5$ células/mL, seguido por T₃ con un valor de $59.61 \pm 1.34 \times 10^5$ células/mL y T₂, $53.72 \pm 1.34 \times 10^5$ células/mL, en comparación con el control (T₁), cuyo valor más alto fue de $35.20 \pm 1.34 \times 10^5$ células/mL. Lo anterior se confirma con base estadística a través de la prueba de comparación múltiple (Tukey), donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre T₄ con respecto a T₁, T₂ y T₃, presentando a partir del segundo día los mayores valores de densidad celular. No se encontraron diferencias significativas entre T₂ y T₃, pero si a frente a T₁ (ver Anexo 6).

En la Figura 17 se aprecian las curvas de crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* obtenidas para los diferentes tratamientos aplicados. Desde el primer día de cultivo, los tratamientos T₂, T₃, y T₄ entraron a su fase exponencial (log), el cual duro hasta el cuarto día. Mientras que el tratamiento control (T₁) no se observó ningún incremento de su densidad sino hasta el segundo día que entro a fase log. Esta fase es importante debido a que el cultivo puede cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento de densidad (Richmond 2008).

Tabla 21: Valores de la densidad celular obtenidos durante los días de cultivo de *Tetraselmis suecica* (10^5 células/mL)

Días de cultivo	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
	control	1:2000	1:1500	1:1000
0	0.64 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.63 ± 0.02
1	1.45 ± 0.12	2.23 ± 0.12	2.00 ± 0.12	2.28 ± 0.12
2	4.07 ± 0.17	6.28 ± 0.17	6.95 ± 0.17	7.57 ± 0.17
3	6.65 ± 1.26	18.54 ± 1.26	23.43 ± 1.26	31.53 ± 1.26
4	21.08 ± 1.74	38.34 ± 1.74	43.76 ± 1.74	61.67 ± 1.74
5	23.60 ± 1.64	41.60 ± 1.64	45.76 ± 1.64	65.62 ± 1.64
6	25.98 ± 1.67	44.31 ± 1.67	47.97 ± 1.67	70.98 ± 1.67
7	32.12 ± 1.87	50.49 ± 1.87	56.42 ± 1.87	82.77 ± 1.87
8	35.20 ± 1.34	53.72 ± 1.34	59.61 ± 1.34	85.69 ± 1.34

A partir del cuarto día, todos los tratamientos entraron en fase de retardo; en esta fase se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de algunos de los nutrientes (N, P, K, etc.), por lo cual las condiciones de cultivo no son las óptimas, el tiempo requerido para duplicar la población aumenta, reduciéndose así la tasa de crecimiento. Richmond (2008) indica que en esta fase, las microalgas presentan su mayor valor nutritivo y mayor densidad poblacional, además de encontrarse en un estado fisiológico óptimo para alimentar a invertebrados o larvas de organismos acuáticos (Valenzuela *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2008).

La fase estacionaria inicia al séptimo día, la concentración celular permanece más o menos constante, es decir, no hay incremento neto de la población. Richmond (2008) señala que la captación de fosfatos es limitada por el pH elevado (8.0-8.5), además por la pobre penetración de la luz causada por la alta densidad celular (efecto de autosombreado). Rodríguez *et al.* (2007) señala que el crecimiento celular puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular, la tasa de crecimiento se compensa con la tasa de mortalidad celular.

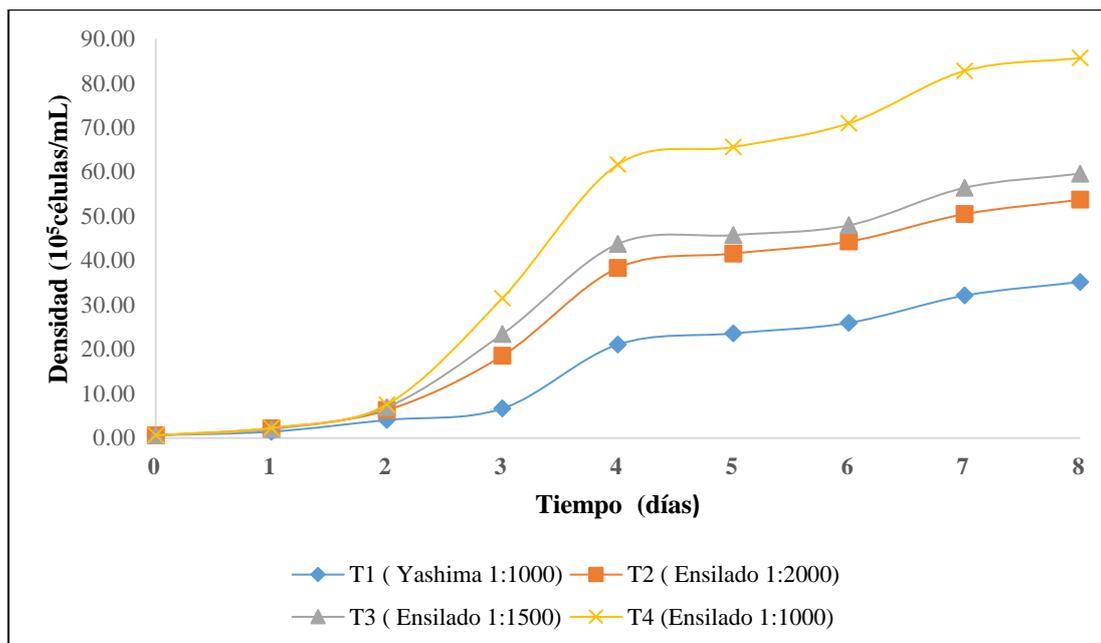


Figura 17: Densidad celular (10^5 células/mL) durante el cultivo de *Tetraselmis suecica*

En la Tabla 22 se presentan los parámetros de crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* obtenidos en la fase exponencial. Se observa mayor tasa específica de crecimiento en T₄ ($1.13 \pm 0.01 \text{ días}^{-1}$), con un tiempo de duplicación de 0.85 ± 0.01 días y mayor número de divisiones por día 1.63 ± 0.02 . Se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre T₄ con respecto a T₁ (0.82 ± 0.01), T₂ (0.96 ± 0.01) y T₃ (1.05 ± 0.01) (ver Anexo 9).

Tabla 22: Valores promedio de los parámetros de crecimiento de *Tetraselmis suecica*

Tratamiento	μ (días^{-1}) ⁽¹⁾	T (días) ⁽²⁾	d ($\text{div}/\text{día}$) ⁽³⁾
T ₁ Yashima (control)	0.82 ± 0.01	0.61 ± 0.01	1.18 ± 0.02
T ₂ Ensilado (1:2000)	0.96 ± 0.01	0.66 ± 0.01	1.39 ± 0.02
T ₃ Ensilado (1:1500)	1.05 ± 0.01	0.72 ± 0.01	1.51 ± 0.02
T ₄ Ensilado (1:1000)	1.13 ± 0.01	0.85 ± 0.01	1.63 ± 0.02

Nota: ⁽¹⁾ tasa específica de crecimiento (μ), ⁽²⁾ tiempo de duplicación (T) y ⁽³⁾ número de divisiones/día (d).

En la Figura 18 se aprecia que el mejor tratamiento para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*, fue el tratamiento T₄, seguido de T₃ y T₂. En general, los tratamientos con diferentes diluciones de ensilado obtuvieron mayores tasas de crecimiento en la fase exponencial que el control (T₁), esto se explicaría por la utilización del nitrógeno amoniacal y aminoácidos presentes en el ensilado, que son de más fácil asimilación por las microalgas (Sánchez *et al.* 2008).

Rodríguez *et al.* (2007) para el cultivo de *Tetraselmis suecica* con medio EM- Bokashi, que es un fertilizante orgánico obtenido mediante fermentación de materia orgánica por acción de los microorganismos eficaces, obtuvo una tasa de crecimiento de 0.74 días⁻¹, el cual fue mayor al obtenida con el medio Yashima (0.48 días⁻¹).

De igual manera, Sánchez *et al.* (2008) utilizando una dilución de 1/1000 de ensilado de pescado y agua de mar (20 ‰), obtuvieron una tasa de crecimiento de 0.88 ± 0.21 día⁻¹, el cual proporciona una buena productividad de la microalga *Nannocloropsis oculata*, en relación a la obtenida cuando utilizaron los medios de cultivo Yashima y Guillard F/2.

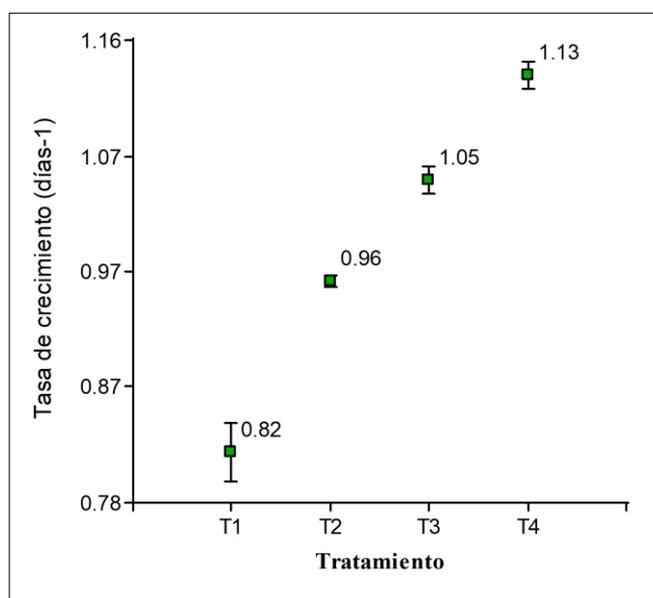


Figura 18: Comportamiento de la tasa de crecimiento μ (días⁻¹)

La tasa de crecimiento durante la fase exponencial del cultivo es un indicador utilizado comúnmente en los trabajos de acuicultura, lo que permite una comparación de los resultados con otras investigaciones (Silva *et al.* 2011).

En investigaciones realizadas con microalgas marinas bentónicas se ha encontrado que con el uso de fertilizantes orgánicos se tiene crecimientos, biomasa y composición química igual que con un medio completo (Guillard F/2) y a un costo de producción más bajo (Simental *et al.* 2001; Simental y Sánchez 2003). En este contexto Sánchez *et al.* (2008) indican que los medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado proporciona buena productividad, bajo costo y buena calidad nutricional en el cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*, en relación con los medios de cultivo Yashima y Guillard F/2. También señalan que el ensilado biológico de pescado tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las microalgas, lo que indica que puede suministrar los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo, además que puede ser usado como medio de producción masiva para la microalgas.

Los rangos de pH se mantuvieron en el rango de 7.0 a 9.0, siendo el valor más bajo de 7.36 y el más alto de 8.45 (ver Anexo 7) durante los 8 días de cultivo.

En la Figura 19 se puede observar que a lo largo del periodo de cultivo el pH se va incrementando como resultado de la absorción de las células de algunos componentes presentes en el medio como el CO₂ y algunos macronutrientes relacionados al pH. El CO₂ actúa como buffer para estabilizar el cultivo evitando los cambios bruscos de pH (Uribe 1993). Se observa que los medios que tienen en su composición una mayor concentración de ensilado (T₄) tienden a presentar valores más altos de pH durante el cultivo, por el contrario los medios que presentan una menor concentración (T₂) presentan valores más bajos, solo superados por el control (T₁). Al ir aumentando la densidad celular, se incrementa también la actividad fotosintética, limitando la disponibilidad de CO₂ y también su efecto amortiguador.

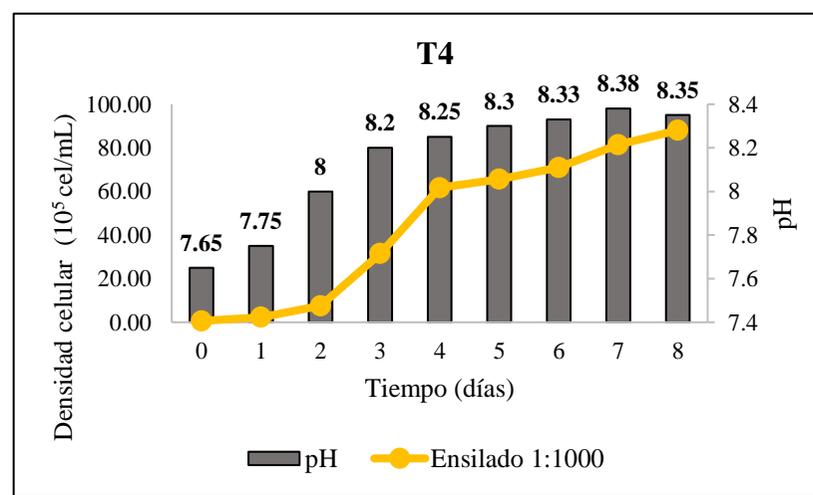
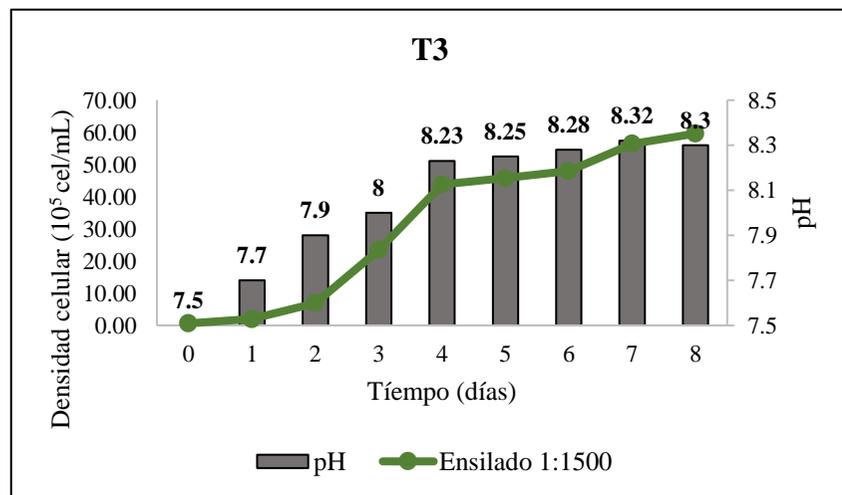
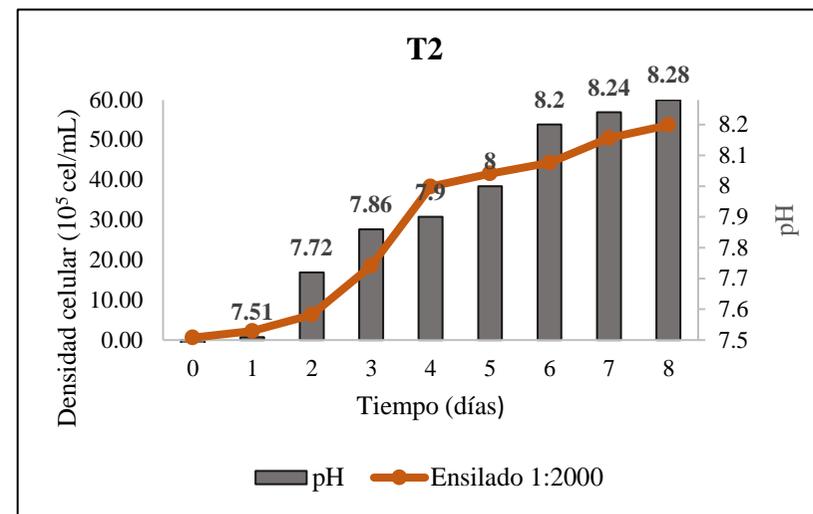
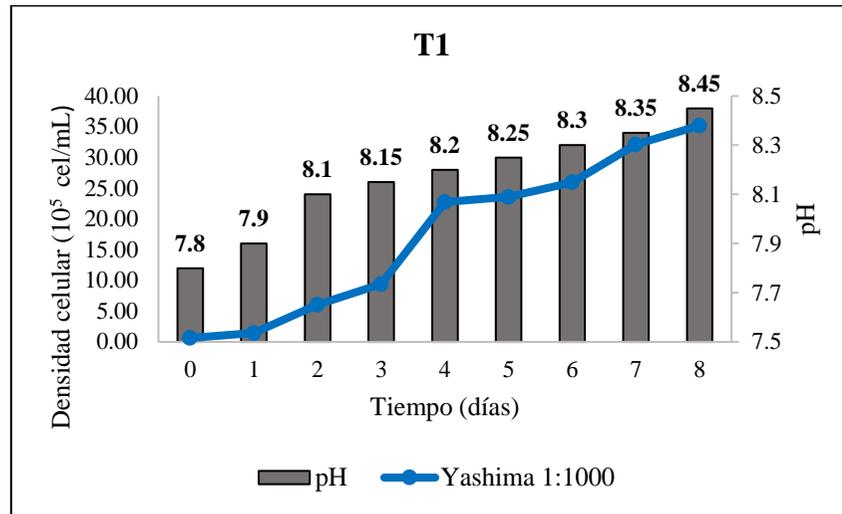


Figura 19: Curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos y su evolución del pH durante los días de cultivo

Hoff y Snell (1993) citado por Rodríguez *et al.* (2007) mencionan que si la concentración de CO₂ es limitada, el pH del cultivo puede elevarse hasta 11, inhibiendo el crecimiento de las microalgas y posterior muerte. El pH de los diferentes tratamientos se mantuvo dentro del rango óptimo, entre 7-9, por lo cual se pudo obtener buenos resultados.

La relación directamente proporcional que se encontró entre la densidad celular y el pH también ha sido reportada para otras microalgas como *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella autotrophica*, *Cylindrotheca sp.* y *Coccolithus elabens* (Moronta *et al.* 2006). Esta relación puede ser explicada por tres sucesos: 1) La actividad fotosintética hace disminuir la concentración de CO₂ en el medio lo que hace que el sistema tampón se altere y se incremente el pH. 2) La absorción del nitrógeno necesario para el crecimiento de las microalgas resulta en un incremento del pH del medio, especialmente cuando la fuente de nitrógeno son los nitratos (Lourenço *et al.* 1997). 3) La luz induce el aumento en la toma de protones por parte de los cloroplastos, alcalinizando el medio. Sin embargo, algunos autores señalan que en algunas especies como *Tetraselmis suecica*, el aumento de pH a valores por encima de 7.5 provoca el descenso en la cantidad de células que se cosechan diariamente posiblemente debido a que el pH altera la actividad de varias enzimas (Helm y Bourne 2006).

En general se concluye, que al usar diferentes diluciones de ensilado de residuos de lisa como medio de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*, se obtienen valores de densidad más altas que al usar un medio control como el medio Yashima.

V. CONCLUSIONES

- Se logró la producción de un ensilado de residuos de lisa (*Mugil cephalus*) para el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* (*Chlorophyta*).
- La utilización de 15 por ciento de melaza y 5 por ciento de B-Lac (T₇) fueron suficientes para producir la acidez necesaria para obtener el ensilado biológico de residuos de lisa a 40 °C por cinco días, con un pH final de 4.28 ± 0.01 y acidez láctica de 4.02 ± 0.03 por ciento.
- El ensilado de residuos de lisa está caracterizado por contener como principales macronutrientes el nitrógeno (18592 mg/L), fósforo (1680.08 mg/L) y potasio (8800 mg/L), los cuales son los componentes mayoritarios en la biomasa de las microalgas. De igual manera, presenta micronutrientes los cuales se presentan en pequeñas cantidades como el magnesio (730 mg/L) y el sodio (154 mg/L), que son vitales para el desarrollo y la actuación de enzimas, así como factores de crecimiento.
- En el ensilado de residuos de lisa no se encontró coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* ni *Salmonella* sp., por lo que se puede afirmar que no contiene organismos patógenos, por ello su utilización no representa ningún riesgo en la calidad de los cultivos, evitando los daños que los residuos orgánicos sin tratar ocasionan.
- El ensilado biológico de residuos de lisa puede ser utilizado como medio de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*, cuando se aplica en diluciones de 1/1000 hasta 1/2000 con agua de mar al 20 ‰.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis de la composición físico química del componente sólido del ensilado de residuos de lisa para poder emplearlo como aditivo en el enriquecimiento del suelo o en la alimentación animal.
- Realizar pruebas biológicas con animales para comprobar si el ensilado de residuos de lisa contribuye a mejorar el incremento de peso y la conversión alimentaria.
- Ampliar los estudios del ensilado de pescado como fertilizante y buscar el modo de aprovechar los huesos y espinas no hidrolizados para incrementar el contenido de fósforo y calcio.
- Evaluar el efecto de aditivos naturales antimicrobianos que prolonguen la vida útil del ensilado de residuos de lisa.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abalde, J; Cid, A; Fidalgo, P; Giménez, G; Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Monografía N° 26. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña, España. 210 p.
2. Abdel-Rahman, MA; Tashiro, Y; Sonomoto, K. 2011. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology* 156(4): 286-301.
3. Ahmed, J; Ramesh, BS; Mahendrakar, NS. 1996. Changes in microbial population during fermentation of tropical freshwater fish viscera. *Journal of Applied Bacteriology* 80(1): 153-156.
4. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2007. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Norma Official Method 942.15. 18th ed. Washington, Estados Unidos de América, Gaithersburg MD. 2007. pt.3.cap.37. p.10-11.
5. Aranganathan, L; Rajasree, R. 2016. Bioconversion of marine trash fish (MTF) to organic liquid fertilizer for effective solid waste management and its efficacy on Tomato growth. *Management of Environmental Quality: An International Journal* 27(1): 93-103.
6. Arredondo, B; Voltolina, D. 2007. Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. In *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. La Paz, Baja California Sur, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 21-29 p.

7. Arrieta, S; Goicochea, C; Moquillaza, P; Mostacero, J. 2010. Edad y crecimiento de la Lisa, *Mugil cepahlus* Linnaeus, en el mar del Callao (12°S), PERÚ. 1996. Informe IMARPE N°37: 71-74.
8. Austin, B; Baudet, E; Stobie, M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases* 15(1): 55-61.
9. Austin, B; Day, J. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90(3-4): 389-392.
10. Becker, EW. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. 1 ed. Cambridge, Gran Bretaña, Cambridge University Press. 293 p.
11. Bello, R; Cardillo, E; Martínez, R. 1993. Estudio del efecto de la adición de frutas tropicales *Ananás comosus* y lechosa *Carica papaya* en la elaboración del ensilado biológico de pescado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 43(3): 221-227.
12. Bello, R; Gutiérrez, M; Ottati, M. 1990. Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(3): 408-425.
13. Ben-Amotz, A; Katz, A; Avron, M. 1982. Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 18(5): 29-37.
14. Berenz, Z. 1997. Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos. In *Tratamiento y utilización de los residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal*. Roma, Italia, FAO. 15-27 p.

15. Bermejo, R; Álvarez-Pez, JM; Acién, FG; Molina, E. 2002. Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93(1): 73-85.
16. Bianchi, M; Brambilla, L; Protani, F; Liu, CL; Lievense, J; Porro, D. 2001. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the Heterologous LDH Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5621-5625.
17. Bossio, FA. 2007. Obtención de un fertilizante basado en residuos de pescado y roca fosfatada. Tesis Lic. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 68 p.
18. Feria, P. 2007. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Maestría. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 84 p.
19. Carr, FJ; Chill, D; Maida, N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28(4): 281-370.
20. Chinchayan, M. 1996. Cultivo de la microalga *Nannocloropsis oculata* y su consumo por el rotífero *Brachionus plicatilis* (línea S). Tesis Lic. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 104 p.
21. Chirichigno, N. Catálogo comentado de los peces marinos en el Perú. IMARPE Informe N° 44: 314p.
22. Cira, LA; Huerta, S; Hall, GM; Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37(12): 1359-1366.

23. Collier, JL; Grossman, AR. 1992. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Phycology* 174(47): 18-26.
24. Contreras, C; Peña, J; Flores, L; Cañizares, R. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28(8): 450-456.
25. Cordero, J; Guevara, M; Morales, E; Lodeiros, C. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista De Biología Tropical* 53(3-4): 325-330.
26. Cordova, E; Bello, R. 1990. Obtención de ensilado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 36(3): 522-536.
27. Corsini, M; Karydis, M. 1990. An algal medium based on fertilizers and its evaluation in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 2(4): 333-339.
28. Creswell, L. 2010. *Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed*. SRAC Publication (5004): 1-16.
29. 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.
30. DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental). 2003. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 24 p.

31. Dural, M; Lugal, MZ; Özak, AA; Derici, B. 2006. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 And *Mugil cephalus* L, 1758 from the Çamlık lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 118(1-3): 65-74.
32. Estela, W; Rychtera, M; Melzoch, K; Quillama, E; Egoavil, E. 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Rev. peru. biol.* 14(2): 271-275.
33. Esters, A; Zhekisheva, M; Boussiba, S; Khozin-goldberg, I; Zarka, A; Cohen, Z. 2002. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin under stress. *Journal of Phycology* 38(1): 325-331.
34. Fagbenro, OA; Bello-Olusoji, OA. 1997. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food chemistry* 60(4): 489-493.
35. Fajardo, E; Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Lic. Bogotá, Colombia. Universidad Pontificia Javeriana. 92 p.
36. Fenucci, JL. 1988. Manual para la cria de camarones peneidos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 88 p.
37. García, CA; Arrázalo, GS; Durango, AM. 2010. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios* 15(2): 9-26.
38. García, L. 2008. Uso de bacterias probióticas en el ensilado de residuos de pescado. Tesis Lic. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 142 p.

39. Garrity, G. 2006. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Michigan, USA. Springer. 281p.
40. Gonzales, A. 2001. Contribución al conocimiento pesquero y biológico de cinco peces costeros de importancia comercial en el Perú: cabinaza, lisa, lorna, machete y pejerrey. Periodo 1996-2000. IMARPE. Informe N°136: 47.
41. Gonzáles, A; Vaccari, E; Dosi, E; Trilli, A; Rossi, M; Matteuzzi, D. 2000. Enhanced production of L-(+)-lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR. *Biotechnology and Bioengineering* 67(2): 147-156.
42. 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.
43. Gram, L; Huss, HH. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33(1): 121-137.
44. Gutierrez, LA; Montoya, OI; Ruiz, OS. 2005. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC* 36: 1-6.
45. Helm, M; Bourne, N. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Roma, Italia. FAO. 184 p.
46. Herrero, C; Cid, A; Fabregas, J; Abalde, J. 1991. Yields in Biomass and Chemical Constituents of Four Commercially Important Marine Microalgae with Different Culture Media. *Aquacultural Engineering* (10): 99-110.

47. Hirata, K; Tsujimoto, Y; Namba, T; Ohta, T; Hirayanagi, N; Miyasaka, H; Zenk, MH; Miyamoto, K. 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. Journal of bioscience and bioengineering 92(1): 24-29.
48. Holguín, MS; Caicedo, LA; Veloza, LC. 2009. Estabilidad de almacenamiento de ensilados biológicos a partir de residuos de pescado inoculados con bacterias Ácido-Lácticas. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia 56: 95-104.
49. Huss, H. 1998. El Pescado Fresco : Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO Documento Técnico de Pesca N° 348: 202.
50. INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). 2004. Preparación y utilización de compost en hortalizas. Santiago de Chile, Chile, Ministerio de Agricultura. Informativo N°14.
51. IMARPE (Instituto del Mar del Perú); ITP (Instituto Tecnológico Pesquero del Perú). 1996. Compendio Biológico Tecnológico de las Principales Especies Hidrobiológicas Comerciales del Perú. Callao, Perú. Editorial Stella. 143 p.
52. Ito, S. 2006. Caracterización y evaluación de los factores que determinan la calidad nutricional e inocuidad en la producción de fertilizantes orgánicos fermentados. Tesis Magister. Turrialba, Costa Rica. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. 107 p.
53. Kim, JK; Dao, VT; Kong, IS; Lee, HH. 2010. Identification and characterization of microorganisms from earthworm viscera for the conversion of fish wastes into liquid fertilizer. Bioresource Technology 101(14): 5131-5136.

54. Leblanc, H; Cerrato, M; Miranda, A; Valle, G. 2007. Determinación de la calidad de abonos orgánicos a través de bioensayos. *Tierra Tropical* 3(1): 97-107.
55. Lederberg, J. 2000. *Encyclopedia of Microbiology*. 2 ed. San Diego, California. Academic Press. 3848 p.
56. Lindgren, S; Pleje, M. 1983. Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (34): 1057-1067.
57. Llanes, J; Toledo, J; Fernández, I; Lazo, J. 2007. Estudio del ensilado biológico de pescado como inóculo de bacterias lácticas en la conservación de desechos pesqueros. *Revista electrónica de Veterinaria*. 8(9): 1-6.
58. Llanes, J; Toledo, J; Lazo, J. 2006. Producción de alimento húmedo a partir de ensilados de pescado para la alimentación de Tilapia roja (*Oreochromis mossambicus x O. niloticus*). *AquaTIC* (25): 16-21.
59. Lourenço, SO; Lanfer, UM; Mancini-Filho, E; Barbarino, E; Aidar, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148: 153-168.
60. Martinez, R. 2003. Producción de un ensilado biológico a partir de vísceras de pescado de las especies *Prochilodus mariae* (coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (bagre rayado) y *Phractocephalus hemiliopterus* (cajaro). Tesis Ing. Arauca, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
61. Molina, E; Salas, R; Castro, A. 1993. Curva de crecimiento y absorción de nutrimentos en fresa (*Fragaria x ananasa* cv. Chandler) en Alajuela. *Agronomía Costarricense* 17(1): 67-73.

62. Moreira, W. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 294 p.
63. Morillo, N; Finol, M; Valero, K; Soto, A. 2005. Evaluación bacteriológica y organoléptica en dos especies de pescado del lago de Maracaibo, Venezuela. *Veterinaria Tropical* 30(1-2): 61-82.
64. Moronta, R; Morales, E; Mora, R. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron. Luz* 23(1): 27-41.
65. Nwanna, LC. 2003. Nutritional value and digestibility of fermented shrimp head waste meal by African catfish *Clarias gariepinus*. *Pakistan Journal of Nutrition* 2(6): 339-345.
66. Özcelik, S; Kuley, E; Özogul, F. 2016. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 73: 536-542.
67. Padilla, P. 1996. Técnica del ensilado biológico de residuos de pescado para racion animal. *Folia Amazónica* 8(2): 147-151.
68. Papagianni, M. 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology* 3(4): 1-8.
69. Parín, M; Zugarramurdi, A. 1997. Aspectos Económicos del Procesamiento y Uso de Ensilados de Pescado. In *Tratamiento y utilización de los residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal*. Roma, Italia, FAO. 41-64 p.

70. Park, JBK; Craggs, RJ; Shilton, AN. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1): 35-42.
71. Peña, N. 2008. Utilización de residuos de pota (*Dosidicus gigas*), para la obtención de un fertilizante orgánico líquido. Tesis Ing. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 108 p.
72. Piña, P; Medina, MA; Nieves, M; Leal, S; López, JA; Guerrero, MA. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Revista de Investigaciones Marinas* 28(3): 225-236.
73. Plasencia Álvarez, J. 2012. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). Madrid, España. Universidad Politécnica de Madrid.
74. PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2017. Desarrollo Productivo de la Actividad Pesquera. Oficina de Estudios Económicos. 44 p.
75. Ramírez, J; Ulloa, P; Velázquez, M; Ulloa, J; Arce, F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2(7): 16.
76. Ramírez, J; Vázquez, M; Uresti, R; Velázquez, G; Téllez, S. 2006. Aprovechamiento integral de la lisa: alternativa de desarrollo económico para la Laguna Madre de Tamaulipas. *Ciencia UAT* 1(2): 57-60.
77. Ramírez, JC; Huerta, S; Arias, L; Prado, A; Shirai, K. 2008. Utilization of fisheries by-catch and processing wastes for lactic acid fermented silage and evaluation of degree of protein hydrolysis and in vitro digestibility. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(3): 195-204.

78. Reddy, G; Altaf, M; Naveena, B; Venkateshwar, M; Kumar, EV. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 26: 22-34.
79. Renaud, SM; Parry, DL; Thinh, L Van. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology* 6(3): 337-345.
80. Requena, T; Pelaez, C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología* 35(1): 19-44.
81. Richmond, A. (Ed.). 2008. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science. 545 p.
82. Rodríguez, L; Juscamaita, J; Vargas, J. 2007. Efecto of EM-Bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetrasemis suceica* K. *Ecología Aplicada* 6(1,2): 111-116.
83. Rodríguez, T; Montilla, J; Bello, R. 1990. Ensilado de de pescado a partir de fauna acompañamiento del camarón. Elaboración y evaluación biológica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(3): 426-438.
84. Romero, Y; Lodeiros, C; Esclapés, M; Marín, N; Guevara, Miguel; Morales, E. 2002. Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia* 27(3): 104-109.
85. Ruiz-Marin, A; Mendoza-Espinosa, LG; Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101(1): 58-64.

86. Sánchez, H; Benites, E; Ubillus, E; Ochoa, G. 2015. Efecto de tres niveles de ensilado biológico de cabeza de *Penaeus*, en alimentación de cerdos (*Sus escrofa*) en las etapas fisiológicas de gestación y lactación. *Manglar* 10(27-38).
87. 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(1,2): 149-158.
88. Sánchez, H; Ochoa, G. 2016. Producción y valoración de alimentos para animales monogástricos, con ensilado biológico de restos del procesamiento de langostino (*Litopenaeus vannamei*) fermentados con lactobacilos. *Scientia Agropecuaria* 7(3): 181-190.
89. 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*. *The Mediterranean Science Commission* 38: 386-394.
90. Serna, L; Rodríguez, A. 2005. Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado Del Arte. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* 5(1): 54-65.
91. Silva, J; Vásquez, V; Merino, F. 2011. Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria* 2(2): 13-23.
92. Simental, JA; Sánchez, MP. 2003. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 27: 265-272.
93. Simental, JA; Sánchez, MP; Correa, JG. 2001. Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium a common agricultural fertilizer. *Journal of Shellfish Research* 20(2): 611-617.

94. Solano, Y. 2014. Edad y crecimiento de *Mugil cephalus* «lisa» de la Región La Libertas, 2012. Universidad Nacional de Trujillo. 1-42 p.
95. Spanopoulos, M; Ponce, JT; Barba, G; Ruelas, JR; Tiznado, MR; Hernández, C; Shirai, K. 2010. Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis* sp.), para la alimentación de especies acuícolas. Revista Mexicana de Ingeniería Química 9(2): 167-178.
96. Suh, IS; Lee, CG. 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. Biotechnology and Bioprocess Engineering 6(8): 313-321.
97. Sunda, WG; Huntsman, SA. 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. Limnology and Oceanography 45(7): 1501-1516.
98. Swan, H; Karalazos, A. 1990. Las melazas y sus derivados. Revista Tecnología 19: 78-82.
99. Thompson, L; Troeh, F. 1988. Los suelos y su fertilidad. Cuarta Ed. Barcelona, España. Editorial Reverté. 661p.
100. Toledo, J; Llanes, J. 2006. Estudio comparativo de los residuos de pescado ensilados por vías bioquímica y biológica. Revista AquaTIC 25: 28-33.
101. Uribe, E. 1993. Cultivo de Microalgas. Curso Interamericano de Cultivos de Peces Marinos. Antofagasta, Chile. Universidad Católica del Norte. 95-137 p.
102. Valenzuela, C; Carvallo, F; Morales, MS; Reyes, P. 2015. Efecto del uso de ensilado seco de salmón en dietas de pollos broiler sobre parámetros productivos y calidad sensorial de la carne. Archivos de Medicina Veterinaria 47(1): 53-59.

103. Valenzuela, E; Gendrop, V; Pérez, R; Wilburn, G. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (BOONE) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. *Ciencias Marinas* 25(3): 423-437.
104. Vásquez, S; Suárez, H; Zapata, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición* 36(1): 64-71.
105. Velasco, LA; Barros, J; Ospina, G; Trujillo, A. 2009. Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (CLON T-ISO). *Intropica* 4: 93-99.
106. Vidotti, RM; Carneiro, DJ; Macedo Viegas, EM. 2002. Acid and Fermented Silage Characterization and Determination of Apparent Digestibility Coefficient of Crude Protein for Pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33(1): 0-5.
107. Vidotti, RM; Viegas, EMM; Carneiro, DJ. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* 105(1-4): 199-204.
108. Vijayakumar, J; Aravindan, R; Viruthagiri, T. 2008. Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 22(2): 245-264.
109. Wang, Y; Tashiro, Y; Sonomoto, K. 2014. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 20(1): 1-9.

110. Webb, J; Worllwork, J; Elgood, J. 1981. Guide to living fish. Londres, Inglaterra. The Memillan press. 147 p.

111. Van Wyk, HJ; Heydenrych, CM. 1985. The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. Journal of the Science of Food and Agriculture 36(11): 1093-1103.

112. Yilmaz, AB. 2003. Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. Environmental Research 92(3): 277-281.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Niveles de pH

Melaza (%)	B-Lac (%)	Tratamiento	R	Días										
				0	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30
5	5	T1	R1	5.88	5.45	5.4	5.5	5.63	6.15	7.07	7.11	7.24	7.32	7.02
			R2	5.89	5.45	5.38	5.49	5.57	6.17	7.08	7.01	7.12	7.25	7.0
			R3	5.86	5.42	5.37	5.52	5.55	6.14	7.06	7.19	7.26	7.42	7.01
		Promedio	5.88	5.44	5.38	5.50	5.58	6.15	7.07	7.10	7.21	7.33	7.01	
5	10	T2	R1	5.66	5.19	5.1	5.28	5.42	6.09	7.05	7.16	7.02	6.94	6.87
			R2	5.66	5.18	5.06	5.26	5.46	6.1	7.08	7.19	7.26	7.1	6.84
			R3	5.6	5.16	5.06	5.25	5.4	6.07	7.04	7.17	7.26	7.11	6.86
		Promedio	5.64	5.18	5.07	5.26	5.43	6.09	7.06	7.17	7.18	7.05	6.86	
5	15	T3	R1	5.41	5.02	4.82	4.91	5.08	5.6	6.85	7.18	7.29	7.09	6.77
			R2	5.38	5.04	4.84	4.94	5.09	5.61	6.8	7.2	7.3	7.09	6.77
			R3	5.41	5.02	4.82	4.9	5.07	5.58	6.8	7.19	7.28	7.1	6.79
		Promedio	5.40	5.03	4.83	4.92	5.08	5.60	6.82	7.19	7.29	7.09	6.78	
10	5	T4	R1	5.72	5.08	4.46	4.41	4.45	4.67	4.8	5.29	5.3	5.47	5.43
			R2	5.69	5	4.45	4.4	4.42	4.65	4.79	5.3	5.31	5.49	5.46
			R3	5.68	4.9	4.46	4.43	4.43	4.66	4.56	5.27	5.29	5.48	5.44
		Promedio	5.70	4.99	4.46	4.41	4.43	4.66	4.72	5.29	5.30	5.48	5.44	
10	10	T5	R1	5.53	4.78	4.31	4.26	4.33	4.5	4.45	5.28	5.29	5.39	5.22
			R2	5.51	4.78	4.33	4.28	4.37	4.55	4.5	5.24	5.25	5.37	5.24
			R3	5.49	4.74	4.31	4.27	4.31	4.48	4.48	5.26	5.28	5.39	5.21
		Promedio	5.51	4.77	4.32	4.27	4.34	4.51	4.48	5.26	5.27	5.38	5.22	
10	15	T6	R1	5.04	4.64	4.28	4.19	4.23	4.36	4.62	5.22	5.19	5.17	5.08
			R2	5.01	4.64	4.27	4.2	4.23	4.32	4.45	5.25	5.16	5.13	5.05
			R3	5.03	4.65	4.24	4.22	4.21	4.35	4.43	5.06	5.18	5.15	5.07
		Promedio	5.03	4.64	4.26	4.20	4.22	4.34	4.50	5.18	5.18	5.15	5.07	
15	5	T7	R1	5.4	4.74	4.42	4.16	4.17	4.27	4.29	4.31	4.19	4.19	4.24
			R2	5.38	4.77	4.39	4.14	4.15	4.29	4.31	4.33	4.21	4.2	4.2
			R3	5.4	4.75	4.41	4.15	4.17	4.28	4.3	4.35	4.23	4.21	4.23
		Promedio	5.39	4.75	4.41	4.15	4.16	4.28	4.30	4.33	4.21	4.20	4.22	
15	10	T8	R1	5.13	4.68	4.35	4.05	4.08	4.23	4.14	4.27	4.1	4.09	4.15
			R2	5.14	4.68	4.37	4.08	4.07	4.2	4.15	4.25	4.12	4.11	4.14
			R3	5.12	4.71	4.34	4.09	4.1	4.24	4.18	4.3	4.14	4.12	4.16
		Promedio	5.13	4.69	4.35	4.07	4.08	4.22	4.16	4.27	4.12	4.11	4.15	
15	15	T9	R1	4.98	4.65	4.2	4.05	4.08	4.17	4.16	4.2	4.11	4.08	4.09
			R2	4.97	4.66	4.21	4.04	4.06	4.15	4.18	4.22	4.13	4.1	4.12
			R3	4.93	4.67	4.23	4.06	4.08	4.19	4.14	4.19	4.1	4.09	4.1
		Promedio	4.96	4.66	4.21	4.05	4.07	4.17	4.16	4.20	4.11	4.09	4.10	

Anexo 2: Prueba estadística para el pH

2.1 Análisis de varianza

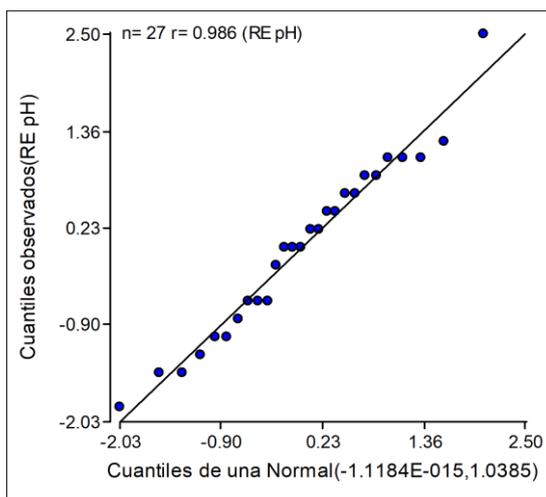
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16.08	8	2.01	5216.78	<0.0001
Melaza (%)	15.35	2	7.68	19928.43	<0.0001
B-Lac (%)	0.52	2	0.26	668.84	<0.0001
Melaza (%)*B-Lac (%)	0.21	4	0.05	134.92	<0.0001
Error	0.01	18	3.90E-04		
Total	16.08	26			

Para el pH se hizo el análisis de varianza; con ello se buscó analizar si los componentes interactuaban, en este caso la melaza y B-Lac, en la Tabla de arriba se aprecia que el p valor resulta significativo, lo que quiere decir que hay interacción entre los factores. Sin embargo, para tener el resultado final, se necesita que se cumplan los supuestos, en este caso la normalidad de varianzas y normalidad de errores.

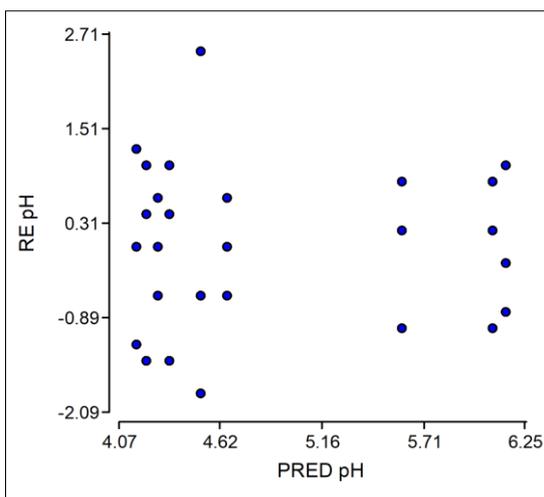
2.2 Cumplimiento de supuestos

En la letra a), el valor de r es mayor a 0.94, lo que indica que hay normalidad; mientras en letra b), la dispersión entre los residuos y los valores predichos, no forman un patrón o un cono, lo cual permite asumir que hay homogeneidad de varianzas. Por lo tanto, se puede concluir, que hay interacción entre los factores; o sea entre la melaza y B-Lac. Además, el modelo estadísticamente está bien, por lo que se pudo hacer la comparación Tukey.

a) Normalidad de errores



b) Homogeneidad de varianzas



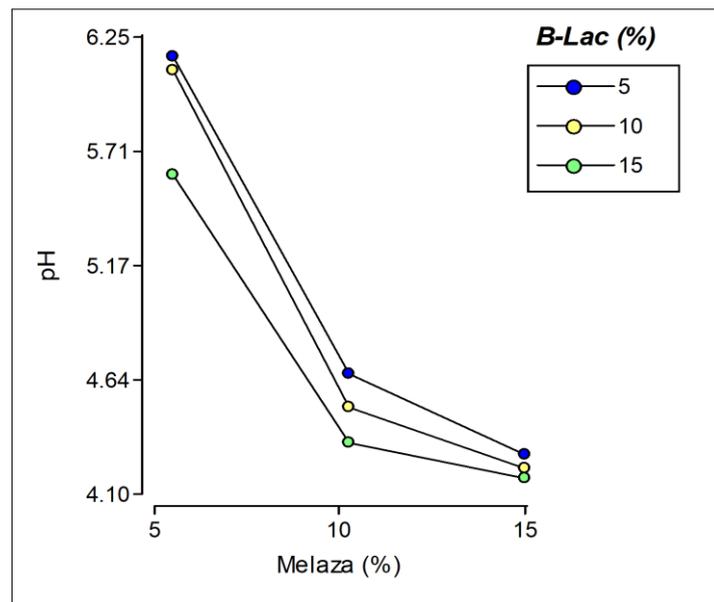
2.3 Comparación múltiple

Tratamiento	Melaza (%)	B-Lac (%)	Medias	E.E.	Grupos*								
T ₁	5	5	6.15	0.01	A								
T ₂	5	10	6.09	0.01		B							
T ₃	5	15	5.6	0.01			C						
T ₄	10	5	4.66	0.01				D					
T ₅	10	10	4.51	0.01					E				
T ₆	10	15	4.34	0.01						F			
T ₇	15	5	4.28	0.01							G		
T ₈	15	10	4.22	0.01								H	
T ₉	15	15	4.17	0.01									H

Nota: (*) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El T₉ y el T₈ tienen medias iguales de acuerdo a la comparación de Tukey, mientras los tratamientos T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ y el T₇ son diferentes.

2.4 Gráfica de la comparación múltiple para nivel de pH



Anexo 3: Porcentajes de ácido láctico (expresado en %)

Melaza (%)	B-lac (%)	Tratamiento	R	Días										
				0	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30
5	5	T1	R1	0.15	0.63	1.49	1.22	1.44	1.40	0.72	0.68	0.36	0.20	0.41
			R2	0.14	0.59	1.58	1.31	1.40	1.44	0.77	0.72	0.32	0.23	0.36
			R3	0.15	0.63	1.53	1.26	1.35	1.35	0.63	0.63	0.34	0.18	0.36
		Promedio		0.15	0.62	1.53	1.26	1.40	1.40	0.71	0.68	0.34	0.20	0.38
5	10	T2	R1	0.21	0.81	1.71	1.62	1.67	1.40	0.59	0.72	0.45	0.45	0.68
			R2	0.18	0.72	1.80	1.67	1.58	1.26	0.45	0.77	0.45	0.36	0.65
			R3	0.21	0.77	1.76	1.58	1.53	1.35	0.68	0.72	0.36	0.41	0.64
		Promedio		0.20	0.77	1.76	1.62	1.59	1.34	0.57	0.74	0.42	0.41	0.66
5	15	T3	R1	0.36	0.99	2.43	1.98	2.07	1.58	0.77	0.79	0.41	0.32	0.54
			R2	0.34	0.95	2.39	2.03	2.12	1.53	0.68	0.77	0.41	0.32	0.54
			R3	0.36	0.90	2.43	2.03	2.07	1.62	0.81	0.81	0.43	0.41	0.56
		Promedio		0.35	0.95	2.42	2.01	2.09	1.58	0.75	0.79	0.42	0.35	0.55
10	5	T4	R1	0.16	1.31	2.93	3.71	3.58	3.58	3.33	3.60	3.26	2.79	2.97
			R2	0.17	1.26	2.88	3.74	3.74	3.65	3.40	3.67	3.38	2.88	3.02
			R3	0.17	1.40	3.02	3.78	3.83	3.69	3.42	3.65	3.33	2.79	2.93
		Promedio		0.17	1.32	2.94	3.74	3.71	3.64	3.38	3.64	3.32	2.82	2.97
10	10	T5	R1	0.20	1.44	3.06	3.69	3.83	3.38	3.42	3.62	3.20	2.93	3.11
			R2	0.18	1.35	3.24	3.83	3.78	3.47	3.47	3.65	3.11	3.06	3.20
			R3	0.18	1.35	3.29	3.92	3.96	3.56	3.56	3.69	3.24	2.97	3.06
		Promedio		0.19	1.38	3.20	3.81	3.86	3.47	3.48	3.65	3.18	2.99	3.12
10	15	T6	R1	0.24	1.67	2.84	3.92	3.74	3.92	3.38	3.87	3.56	3.02	3.29
			R2	0.23	1.49	2.93	4.05	3.78	3.87	3.56	3.96	3.47	2.93	3.26
			R3	0.25	1.58	3.02	4.05	3.83	3.92	3.60	3.83	3.38	2.97	3.24
		Promedio		0.24	1.58	2.93	4.01	3.78	3.90	3.51	3.89	3.47	2.97	3.26
15	5	T7	R1	0.30	1.13	3.42	4.82	4.39	4.10	3.92	4.37	4.28	4.28	4.57
			R2	0.30	1.08	3.38	4.77	4.37	4.19	3.96	4.46	4.37	4.28	4.55
			R3	0.31	1.13	3.47	4.86	4.32	4.10	3.87	4.32	4.28	4.14	4.50
		Promedio		0.30	1.11	3.42	4.82	4.36	4.13	3.92	4.38	4.31	4.23	4.54
15	10	T8	R1	0.45	1.62	3.65	5.04	4.50	4.28	4.37	4.55	4.50	4.23	4.73
			R2	0.47	1.67	3.69	5.13	4.64	4.32	4.41	4.64	4.59	4.28	4.64
			R3	0.45	1.67	3.71	5.09	4.61	4.23	4.37	4.50	4.37	4.23	4.59
		Promedio		0.46	1.65	3.68	5.09	4.58	4.28	4.38	4.56	4.49	4.25	4.65
15	15	T9	R1	0.58	1.58	3.96	5.13	4.82	4.48	4.39	4.95	4.64	4.50	4.73
			R2	0.56	1.58	4.05	5.11	4.77	4.41	4.37	4.86	4.50	4.55	4.68
			R3	0.59	1.60	3.92	5.18	4.86	4.50	4.41	4.91	4.55	4.64	4.77
		Promedio		0.58	1.58	3.98	5.14	4.82	4.46	4.39	4.91	4.56	4.56	4.73

Anexo 4: Prueba estadística de porcentaje de acidez láctica

4.1 Análisis de Varianza

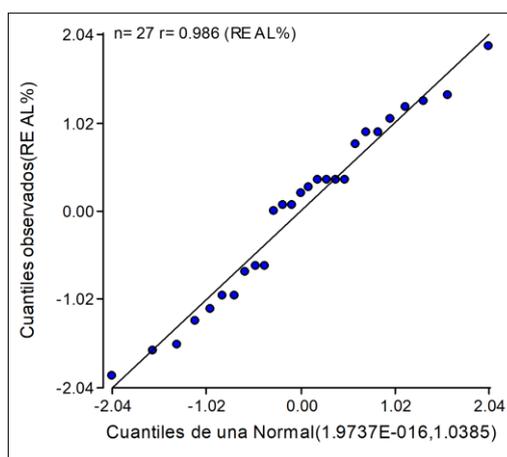
Factores	SC	GL	CM	F	p-valor
B-Lac (%)	0.46	2	0.23	67.64	<0.0001
Melaza (%)	40.46	2	20.23	5969.41	<0.0001
B-Lac (%)*Melaza (%)	0.09	4	0.02	6.65	0.0018
Error	0.06	18	3.40E-03		
Total	41.07	26			

También se midió la acidez láctica de los factores, en este caso de la melaza y el B-Lac, el p valor resultó significativo, indicativo de que hay interacción entre ambos. Pero para probar que haya validez estadística, se probó los supuestos.

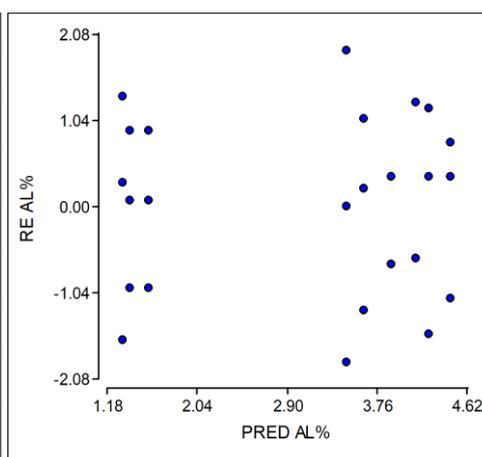
4.2 Cumplimiento de supuestos

En la letra a) se probó la normalidad, el r fue 0.986, indicador que hay normalidad; en la letra b) la homocedasticidad, se aprecia una dispersión en la interacción entre los residuos y los valores predichos, muestra de que hay homogeneidad de varianzas. Por lo tanto, ya cumpliéndose los supuestos, estadísticamente se puede concluir que hay interacción entre los factores, de la melaza y el B-Lac, tanto en el pH como en la acidez láctica.

a) Normalidad de errores



b) Homogeneidad de varianzas



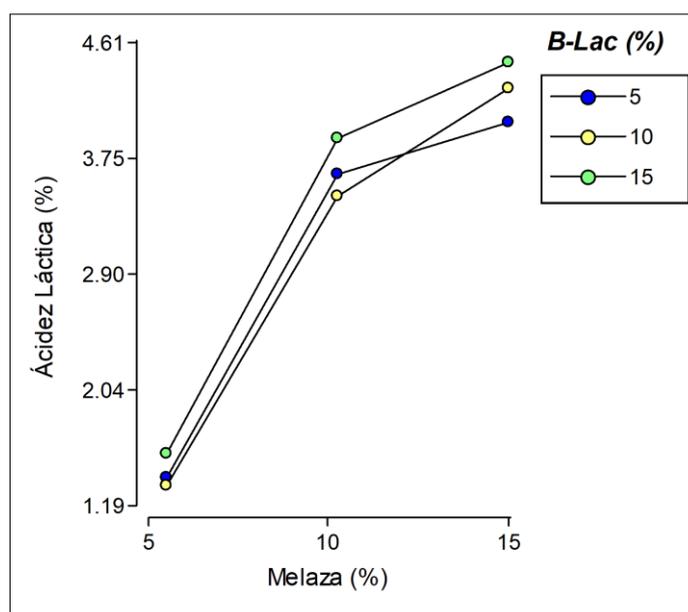
4.3 Comparación múltiple

Tratamiento	Melaza (%)	B-Lac (%)	Medias	n	E.E.	Grupos*					
T ₂	5	10	1.34	3	0.03	A					
T ₁	5	5	1.4	3	0.03	A					
T ₃	5	15	1.58	3	0.03		B				
T ₅	10	10	3.47	3	0.03			C			
T ₄	10	5	3.64	3	0.03				D		
T ₆	10	15	3.9	3	0.03					E	
T ₇	15	5	4.13	3	0.03						F
T ₈	15	10	4.28	3	0.03						F
T ₉	15	15	4.46	3	0.03						G

Nota: (*) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Según la comparación Tukey, las medias del T₁ y el T₂ son similares, así mismo del T₇ y T₈. En el caso de los T₃, T₄, T₅, T₆ y T₉ son diferentes.

4.4 Gráfica de comparación múltiple para nivel de acidez láctica (%)



Anexo 5: Valores de pH y porcentaje de acidez láctica del ensilado producido a escala piloto

Días	pH	AL (%)
0	5.43	0.31
1	4.86	1.03
2	4.49	3.09
3	4.28	4.44
4	4.33	4.11
5	4.35	3.95

Anexo 6: Densidad celular obtenida durante los días de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* (10⁵ células/mL)

Tratamientos		Días de cultivo									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
T₁ (Control)	R ₁	0.65	1.43	3.84	6.83	20.88	23.54	27.92	32.15	34.91	
	R ₂	0.61	1.38	3.98	6.05	18.65	21.76	23.38	30.38	33.28	
	R ₃	0.68	1.53	4.39	7.08	23.73	25.49	26.64	33.84	37.41	
	Prom.	0.64	1.44	4.07	6.65	21.08	23.60	25.98	32.12	35.20	
T₂ Ensilado (1/2000)	R ₁	0.58	1.98	5.89	15.64	36.05	38.73	40.57	49.33	52.84	
	R ₂	0.63	2.46	6.54	20.73	40.23	44.15	48.18	50.10	53.64	
	R ₃	0.60	2.25	6.41	19.27	38.75	41.93	44.18	52.04	54.69	
	Prom.	0.60	2.23	6.28	18.54	38.34	41.60	44.31	50.49	53.72	
T₃ Ensilado (1/1500)	R ₁	0.58	1.88	6.86	20.48	39.87	42.90	44.57	54.76	58.81	
	R ₂	0.66	2.18	7.08	25.55	46.55	48.25	50.51	57.93	60.96	
	R ₃	0.63	1.96	6.91	24.25	44.85	46.13	48.83	56.58	59.06	
	Prom.	0.63	2.00	6.95	23.43	43.76	45.76	47.97	56.42	59.61	
T₄ Ensilado (1/1000)	R ₁	0.63	2.23	7.56	31.15	62.95	67.05	71.77	82.79	86.84	
	R ₂	0.59	2.04	7.25	29.53	58.03	61.35	68.63	80.98	81.39	
	R ₃	0.67	2.58	7.89	33.93	64.03	68.46	72.55	84.55	88.84	
	Prom.	0.63	2.28	7.57	31.53	61.67	65.62	70.98	82.77	85.69	

Anexo 7: Valores promedio de los pH obtenidos durante los días de cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*.

Días de cultivo	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
	control	1:2000	1:1500	1:1000
0	7.8	7.65	7.5	7.36
1	7.9	7.75	7.7	7.51
2	8.1	8	7.9	7.72
3	8.15	8.2	8	7.86
4	8.2	8.25	8.23	7.9
5	8.25	8.3	8.25	8
6	8.3	8.33	8.28	8.2
7	8.35	8.38	8.32	8.24
8	8.45	8.35	8.3	8.28

Anexo 8: Análisis de la densidad en el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*

8.1 Análisis de Varianza

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3918.67	3	1306.22	243.72	<0.0001
Tratamiento	3918.67	3	1306.22	243.72	<0.0001
Error	42.88	8	5.36		
Total	3961.54	11			

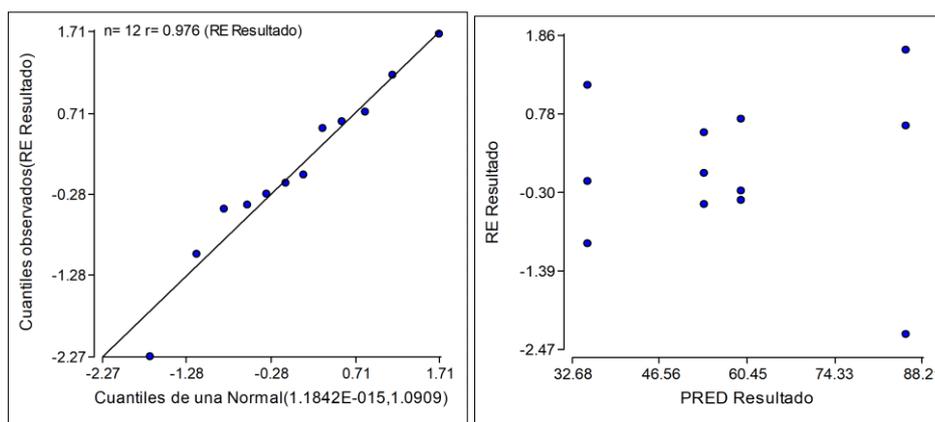
Se hizo el análisis de varianza para la densidad en el cultivo de las microalgas en el día N°8, como se puede apreciar en la Tabla de arriba, resultó significativo, un indicativo de que las medias son distintas.

8.2 Cumplimiento de supuestos

Para comprobar que el modelo está bien, se probó los supuestos; el r fue mayor a 0.94, lo que indica que hay normalidad, y en letra b) se graficó la dispersión entre el error y el valor predicho, como no hay un patrón, es signo de que no hay heterocedasticidad. Se concluye que el modelo está bien, y se puede hacer la comparación Tukey.

Normalidad de errores

Homogeneidad de varianzas



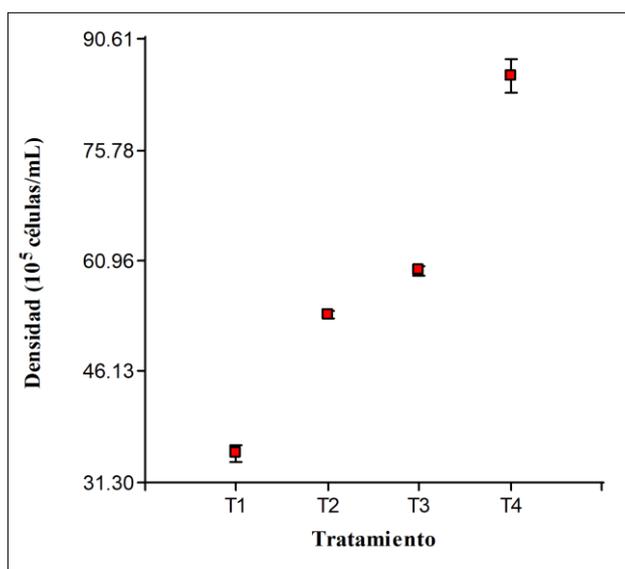
8.3 Comparación múltiple

Tratamiento	Dilución	Medias	n	E.E.	Grupos*	
T1	control	35.2	3	1.34	A	
T2	1/2000	53.72	3	1.34		B
T3	1/1500	59.61	3	1.34		B
T4	1/1000	85.69	3	1.34		C

Nota: (*) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Según la comparación Tukey, las medias del T2 y T3 son iguales. El T1 y T4 son distintos.

8.4 Gráfica de comparación de la densidad celular obtenido en el octavo día del cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*



Anexo 9: Análisis de la tasa de crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica*

9.1 Análisis de Varianza

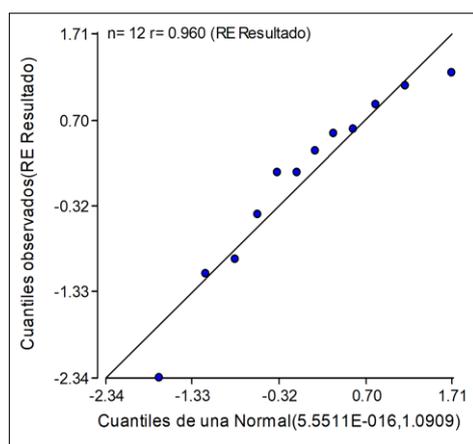
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	0.16	3	0.05	80.72	<0.0001
Tratamiento	0.16	3	0.05	80.72	<0.0001
Error	0.01	8	6.60E-04		
Total	0.16	11			

He hizo el análisis de varianza para la tasa de crecimiento de la microalga, en p valor resultó significativo, lo que quiere decir que las medias son distintos.

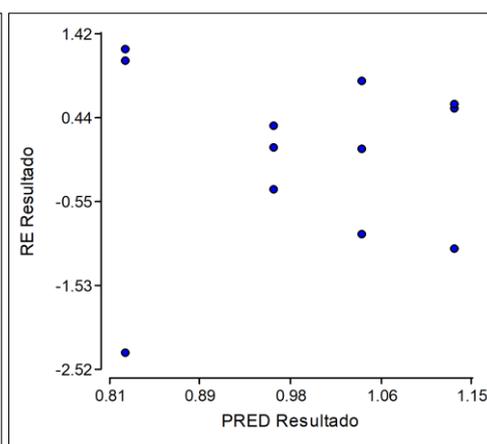
9.2 Cumplimiento de supuestos

Para validar el modelo, se probó los supuestos; en la letra a) se tiene para probar la normalidad, el r fue mayor a 0.94, significa que hay normalidad; en la letra b) para la homocedasticidad, no se forma ningún patrón en la dispersión entre los errores y los valores predichos, lo que significa que no hay heterocedasticidad. Finalmente, el modelo está bien, y puede hacerse la comparación Tukey.

a) Normalidad de errores



b) Homogeneidad de varianzas



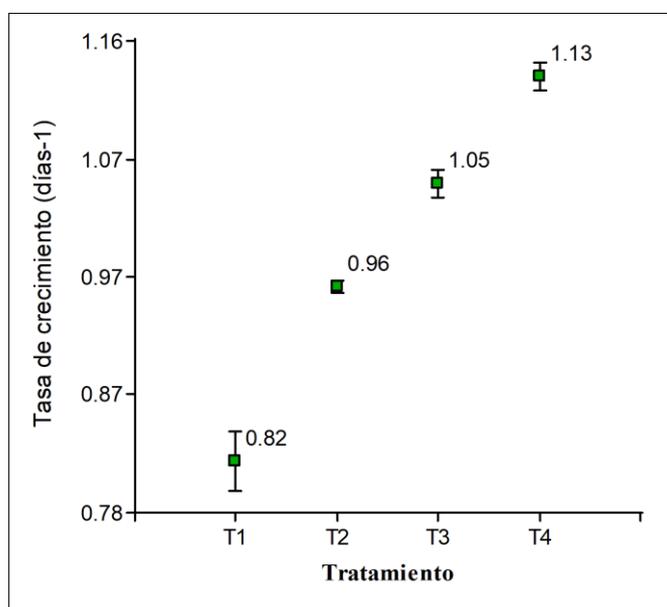
9.3 Comparación múltiple

Tratamiento	Dilución	Medias	n	E.E.	Grupos*		
T1	control	0.82	3	0.01	A		
T2	1/1000	0.96	3	0.01		B	
T3	1/1500	1.05	3	0.01			C
T4	1/1000	1.13	3	0.01			D

Nota: (*) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Según la comparación tukey, las tasas de crecimiento son distintos de todos los tratamientos.

9.4 Gráfica de comparación de la tasa específica de crecimiento (días⁻¹) de la microalga *Tetraselmis suecica* durante la fase exponencial



Anexo 10: Composición química de los tratamientos utilizados en el cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*.

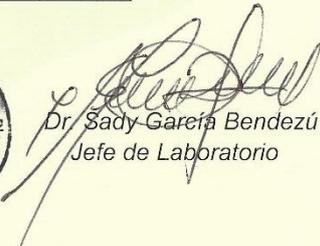
	T1	T2	T3	T4
	control	1:2000	1:1500	1:1000
N (mmol/L)	2.0	0.664	0.9296	1.328
P (mmol/L)	0.102	0.0271	0.0379	0.0542
N:P	20:1	24.501	24.528	24.502

Anexo 11: Composición del Medio Yashima

Componentes	Valores
Sulfato de Amonio	100 g/L
Superfosfato de Calcio	15 g/L
Urea	15 g/t
Clewat 32	30–50 g/L
Componentes de Clewat 32	
FeCl ₂ (como fuente de Fe)	3.85 g/L
ZnCl ₂ (como fuente de Zn)	1.66 g/L
MnCl ₂ (como fuente de Mn)	7.75 g/L
CoCl ₂ (como fuente de Co)	0.17 g/L
CuSO ₄ (como fuente de Cu)	0.07 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (como fuente de Mo)	6.32 g/L
H ₃ BO ₃	24.70 g/L
EDTA.Na ₂	0.05 g/L

Anexo 12: Informes de Laboratorio

12.1 Análisis físico-químico de los residuos de lisa (*Mugil cephalus*)

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE AGRONOMIA LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES						
INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA							
SOLICITANTE	:	LETICIA FERNANDEZ FUTURI					
PROCEDENCIA	:	LIMA/ CALLAO/ VENTANILLA					
MUESTRA DE	:	RESIDUOS DEL FILETEADO DEL PESCADO LIZA					
REFERENCIA	:	H.R. 60378					
FECHA	:	19/09/17					
Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	C %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
608		5.81	14.80	39.34	7.08	3.29	0.72
Nº LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Na %			
608		6.02	0.20	0.34			
Nº LAB	CLAVES	Fe ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	B ppm	
608		143	5	60	53	69	
Nº LAB	CLAVES	Pb ppm	Cd ppm	Cr ppm			
608		15.28	1.69	4.58			
							
		 Dr. Sady García Bendezu Jefe de Laboratorio					
Av. La Molina s/n Campus UNALM Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe							

12.2 Análisis físico químico del ensilado líquido de residuos de lisa (*Mugil cephalus*)



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : LETICIA FERNÁNDEZ FUTURI
 PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
 MUESTRA DE : BIOL
 REFERENCIA : H.R. 60359
 BOLETA : 740
 FECHA : 14/09/17

N° LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	Sólidos Totales g/L	M.O. en Solución g/L	N Total mg/L	P Total mg/L	K Total mg/L
607		4.57	20.70	386.36	348.28	18592.00	1680.08	8800.00

N° LAB	CLAVES	Ca Total mg/L	Mg Total mg/L	Na Total mg/L	Pb Total mg/L	Cd Total mg/L	Cr Total mg/L
607		2935.00	730.00	154.00	6.59	0.85	0.13

LAB	CLAVES	Fe Total mg/L	Cu Total mg/L	Zn Total mg/L	Mn Total mg/L	B Total mg/L
607		65.25	2.45	4.10	1.60	3.30


 Dr. Sady García Bendejé
 Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
 Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622
 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

12.3 Análisis microbiológico de los residuos de lisa (*Mugil cephalus*).

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú Teléfono: 6147800 anexo 274	
INFORME DE ENSAYO N° 1709518- LMT		
SOLICITANTE	: LETICIA FERNÁNDEZ FUTURI	
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO		
MUESTRA	: RESIDUOS DE PESCADO 1709518)	
PROCEDENCIA	: UNALM	
TIPO DE ENVASE	: Bolsa de plástico	
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.	
ESTADO Y CONDICIÓN	: En buen estado y cerrado	
FECHA DE MUESTREO	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE INICIO DE ENSAYO	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO	: 2017 - 09 - 11	
RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA		
Análisis Microbiológico	Muestra 1709518	
¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/g.)	> 11 x 10 ²	
¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/g.)	4	
¹ Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/g.)	< 3	
¹ Detección de <i>Salmonella</i> sp. en 25 g..	Ausencia	
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g.)	96 x 10 ²	
¹ Recuento de Mohos y levaduras (UFC/g.)	98 x 10	
Métodos: ¹ International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.		
Observaciones: Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante. Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita. Validez del documento: Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.		
La Molina, 19 de septiembre del 2017		
		
DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" Universidad Nacional Agraria La Molina Teléfono: 6147800 anexo 274 E-mail: lmnt@lamolina.edu.pe		
		
LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"		
☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmnt@lamolina.edu.pe		

12.4 Análisis microbiológico del ensilado líquido de residuos de lisa (*Mugil cephalus*).

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú Teléfono: 6147800 anexo 274	
INFORME DE ENSAYO Nº 1709519-LMT		
SOLICITANTE : LETICIA FERNANDEZ FUTURI		
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO		
MUESTRA : ENSILADO DE PESCADO 1709519)		
PROCEDENCIA	: UNALM	
TIPO DE ENVASE	: Botella de plástico	
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra x 01 und. x 450 ml . aprox.	
ESTADO Y CONDICIÓN	: En buen estado y cerrado	
FECHA DE MUESTREO	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE INICIO DE ENSAYO	: 2017 - 09 - 01	
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO	: 2017 - 09 - 11	
RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA		
Análisis Microbiológico	Muestra 1709519	
¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/mL)	4	
¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL)	< 3	
¹ Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	< 3	
¹ Detección de <i>Salmonella sp. en 25 mL</i>	Ausencia	
¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp.</i> (UFC/mL)	24 x 10 ⁵	
¹ Recuento de Mohos y levaduras (UFC/mL)	< 10	
Métodos:		
¹ International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.		
Observaciones:		
Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.		
Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.		
Validez del documento:		
Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.		
La Molina, 19 de septiembre del 2017		
		
DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA		
Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" Universidad Nacional Agraria La Molina		
Teléfono: 6147800 anexo 274 E-mail: lmt@lamolina.edu.pe		
		
LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"		
☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe		

12.5 Análisis químico proximal del ensilado líquido de residuos de lisa (*Mugil cephalus*).



CNTA
ADitech







ENAC
ENSAYOS

CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA (CNTA)
 Sede principal: Crta NA-134 km 53. 31570 San Adrián. Navarra (España)
 Tel: +34 948 670 159 | www.cnta.es | cnta@cnta.es
 Oficina Perú: Av. Javier Prado Oeste 1520 San Isidro. Lima (Perú)
 Tel: +51 01 422 2910 | www.cnta.es | recepcion.pe2@cnta.com.pe

Nº 108 LE283
 Nº 108 LE1469
 * Los ensayos marcados no están amparados por la acreditación ENAC

INFORME DE ANÁLISIS

Nº Muestra: **1750049**

Cliente: LETICIA FERNANDEZ FUTURI

RUC: 72514766

Domicilio:
Población: , LIMA

Muestra de: ENSILADO DE RESIDUOS DE LISA

Formato: ENVASE

Clave: MUESTRA.1

Nº: 3456720

Recepción: 16/10/2017

Inicio análisis: 16/10/2017

Fin análisis: 26/10/2017

DETERMINACIÓN	RESULTADO	MÉTODO/TÉCNICA
VALOR NUTRICIONAL BÁSICO		
Proteína	13 g/100 g	ME.Q.18 Vol. Met. Kjeldhal
Grasa	12 g/100 g	ME.Q.16 Extrec. éter ofílico
Cenizas	3.8 g/100 g	ME.Q.15 Grav. Calcificación
* Hidratos de carbono	10.3 g/100 g	ME.Q.20 Cálculo
* Valor energético (Kcal)	201.2 Kcal/100 g	ME.Q.20 Cálculo
* Valor energético (KJul)	840.1 KJ/100 g	ME.Q.20 Cálculo
VALOR NUTRICIONAL BÁSICO		
Humedad	60.9 g/100 g	ME.Q.13/01 Grav. Microondas

Los datos identificativos de la muestra han sido proporcionados por el propio cliente.
 La muestra fue facilitada por el propio cliente, salvo indicación expresa en contra.
 El análisis sólo da fé de la muestra analizada.
 Este boletín no se puede reproducir parcialmente sin la aprobación por escrito de la entidad emisora.
 La incertidumbre de las medidas de ensayo está calculada (95 % confianza, k=2) en los casos que aplique y a disposición de los clientes que lo soliciten.
 La indicación del símbolo "<" delante del resultado emitido, implica que es inferior al límite de cuantificación del método.

Realizado por: FISICOQUIMICO GENERAL

en CNTA (San Adrián), 30/10/2017

Responsable de Departamento



Almudena Martinez



Pág. 1 / 1

12.6 Análisis químico proximal del ensilado líquido de residuos de lisa (*Mugil cephalus*).

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION LABORATORIO DE EVALUACION NUTRICIONAL DE ALIMENTOS														
“Año del Buen Servicio al Ciudadano”															
INFORME DE ENSAYO LENA N° 0335/2017															
CLIENTE	: Leticia Fernandez futuri														
NOMBRE DEL PRODUCTO	: Fermentación Homoláctica de residuos de pescado (Denominación responsabilidad del cliente)														
MUESTRA	: PROPORCIONADA POR EL CLIENTE														
FECHA DE RECEPCIÓN	: 27-03-2017														
FECHA DE ANÁLISIS	: Del 27/03/17 al 31/03/17														
CANTIDAD DE MUESTRA	: 732 gramos														
PRESENTACION	: Muestra en bolsa de polietileno														
IDENTIFICACION	: AQ17-0335														
RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICO															
<table border="1"><thead><tr><th>ANALISIS</th><th>Resultados</th></tr></thead><tbody><tr><td>a.- HUMEDAD,%</td><td>68.02</td></tr><tr><td>b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %</td><td>11.51</td></tr><tr><td>c.- GRASA, %</td><td>10.72</td></tr><tr><td>d.- FIBRA CRUDA, %</td><td>0.0</td></tr><tr><td>e.- CENIZA,%</td><td>2.98</td></tr><tr><td>f.- ELN¹,%</td><td>6.77</td></tr></tbody></table>		ANALISIS	Resultados	a.- HUMEDAD,%	68.02	b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	11.51	c.- GRASA, %	10.72	d.- FIBRA CRUDA, %	0.0	e.- CENIZA,%	2.98	f.- ELN ¹ ,%	6.77
ANALISIS	Resultados														
a.- HUMEDAD,%	68.02														
b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	11.51														
c.- GRASA, %	10.72														
d.- FIBRA CRUDA, %	0.0														
e.- CENIZA,%	2.98														
f.- ELN ¹ ,%	6.77														
ELN ¹ = EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO															
Métodos utilizados:															
a.- AOAC (2005), 950.46															
b.- AOAC (2005), 984.13															
c.- AOAC (2005), 2003.05															
d.- AOAC (2005), 962.09															
e.- AOAC (2005), 942.05															
Atentamente,															
La Molina, 31 de Marzo del 2017															
 Ing. Gloria Palacios Pinto Jefe del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos															
															
Av. La Molina s/n Lima 12. E-mail: lena@lamolina.edu.pe Teléfonos: 614-7800 Anexo: 266 / Directo 348-0830															

Anexo 13: Registro fotográfico



Fotografía 1. Residuos del fileteado de lisa (*Mugil cephalus*)



Fotografía 2. Mezcla de los insumos melaza y B-La



Fotografía 3. Preparación de los tratamientos de laboratorio



Fotografía 4. Incubación a 40°C de todos los tratamientos



Fotografía 5. Mezcla de los residuos del fileteado de lisa, melaza y B-Lac en el bioreactor de 40 L



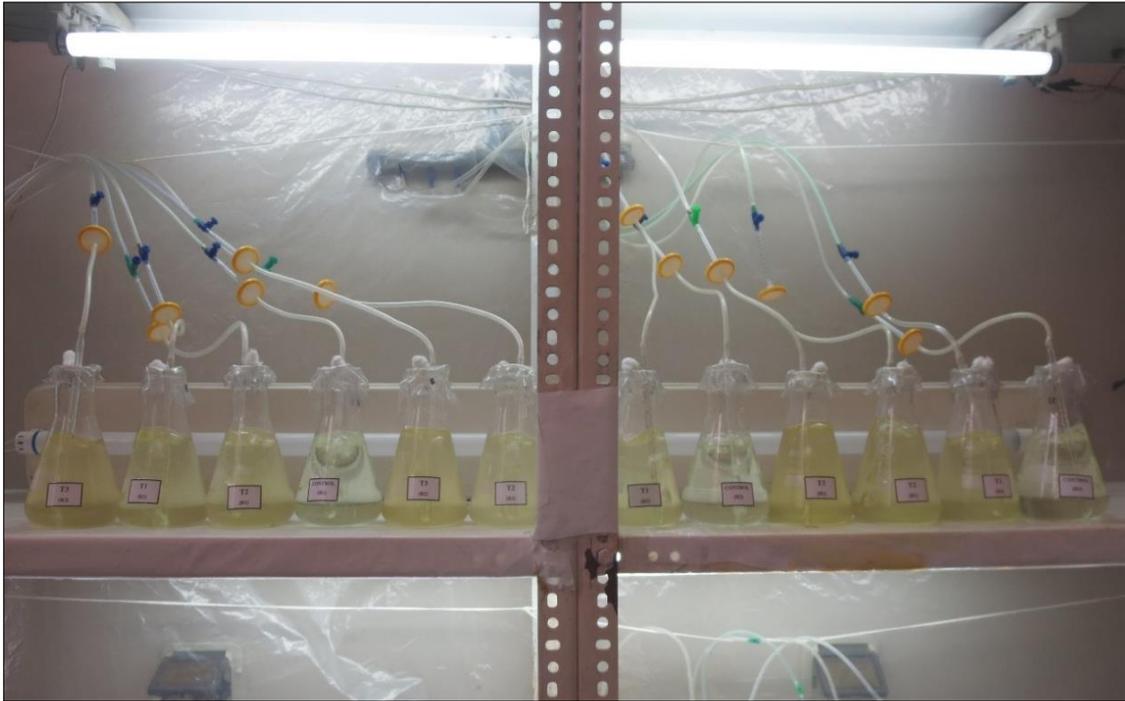
Fotografía 6. Fermentación de los residuos del fileteado de lisa al quinto día en el bioreactor de 40 L



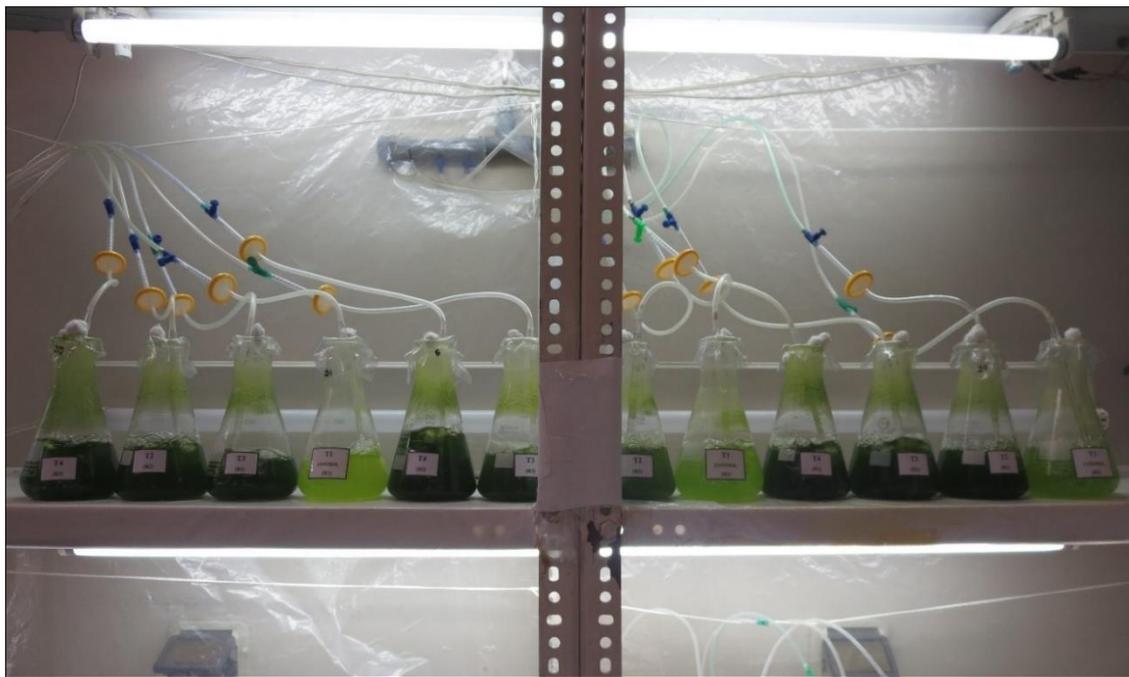
Fotografía 7. Componente líquido del ensilado producido a escala piloto.



Fotografía 8. Componente sólido del ensilado producido a escala piloto.



Fotografía 9. Cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* en el día 0



Fotografía 10. Cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica* en el día 08