

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERIA**



**“APROVECHAMIENTO DEL AGUA DE LA PRECOCCIÓN DEL  
MANTO DE POTA (*Dosidicus gigas*) EN EL CULTIVO DE LA  
MICROALGA *Chlorella* sp.”**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO**

**EDWIN JORDANO OLIVEROS ESCUDERO**

**LIMA – PERÚ**

**2020**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente  
investigación (Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**

**“APROVECHAMIENTO DEL AGUA DE PRECOCCIÓN DEL  
MANTO DE POTA (*Dosidicus gigas*) EN EL CULTIVO DE LA  
MICROALGA *Chlorella sp.*”**

Presentado por:

**Edwin Jordano Oliveros Escudero**

Tesis para optar el Título de:

**INGENIERO PESQUERO**

**Sustentado y aprobado por el siguiente jurado:**

Mg.Sc. Jessie Vargas Cárdenas  
**Presidente**

M.Eng. María Cristina Miglio Toledo  
**Miembro**

Blgo. Juan G. Juscamaita Morales  
**Miembro**

Dra. Patricia Liliana Gil Kodaka  
**Asesora**

MSc. Carla Aguilar Samanamud  
**Co-asesora**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado de forma muy especial a mis padres y familia que me apoyan en cada uno de mis pasos; así como también a Dios quien siempre es la fuente y motor para poder culminar cada uno de los proyectos que me trazo y, por último, pero no menos importante a todos mis amigos que siempre me acompañan y acompañaron con sus enseñanzas y consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización del presente trabajo de investigación fue posible en primer lugar gracias a la gestión de la Blga. Sheila Zacarías Ríos, mi co-asesora M. Sc. Carla Aguilar Samanamud y asesora Dra. Patricia Gil Kodaka para poder realizar la tesis en las instalaciones del Instituto del Mar del Perú, quienes a su vez me guiaron y corrigieron durante la realización de esta investigación. También agradezco al Blgo. Alberto Oscanoa, Ing. Miguel Cervantes, Quim. Leenin Flores, Quim. Anthony Ruíz, Blga. Gheraldine Ynga, Blga. Carla Fernández, Blga. Andrea Macedo, Ing. Michel López, Ing. Raúl Porras, Tec. Alex Niño, muchas gracias a los grandes profesionales con los que cuenta IMARPE. A la M. Sc. Jessie Vargas y la Magister María Miglio Toledo por la revisión y aportes realizados al presente trabajo.

Agradezco al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) por el apoyo y financiamiento brindado para la realización de esta investigación.

Finalmente, agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado durante todos estos años de formación profesional; ya que sin ellos no hubiera sido posible conseguir todo esto.

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1.	Clasificación taxonómica de la pota.....	5
2.2.	Volúmenes de producción en las diferentes modalidades.....	6
2.3.	Composición proximal del manto de la pota.....	6
2.4.	Procesamiento del manto de pota congelado.....	7
2.5.	Composición química del agua de precocción del manto de pota.....	9
2.6.	Utilización de microalgas en la remoción de nutrientes.....	11
2.6.1.	Sistemas de cultivo.....	12
2.6.2.	Medios de cultivo.....	12
2.6.3.	Métodos de conteo en microalgas.....	14
2.6.4.	Requerimientos nutricionales para la producción de microalgas.....	15
2.6.5.	Remoción de nitrógeno y/o fósforo por las microalgas.....	16
2.6.6.	Relación nitrógeno-fósforo (N:P).....	17
2.6.7.	Factores que afectan el crecimiento microalgal y la remoción de nutrientes.....	18
2.7.	Cinética del crecimiento de las microalgas.....	19
2.7.1.	Fases de crecimiento.....	21
2.8.	La microalga: <i>Chlorella</i> sp.....	23
III.	METODOLOGÍA.....	26
3.1.	Lugar de ejecución.....	26
3.2.	Tipo y diseño de la investigación.....	26
3.3.	Variables.....	27
3.4.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	28
3.5.	Metodología.....	29
3.5.1.	Determinación de la mejor concentración de agua de precocción de pota para el cultivo de la microalga <i>Chlorella</i> sp.....	29
3.5.2.	Determinación de la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de la microalga <i>Chlorella</i> sp., en términos de biomasa y densidad celular en el agua de precocción del manto de pota.....	32
3.5.3.	Determinación del factor de relación N/P del agua de precocción del manto de pota.....	34

3.5.4. Determinación de la concentración diaria y porcentaje promedio final de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos del agua de precocción del manto de pota por la microalga <i>Chlorella</i> sp.....	37
3.5.5. Análisis estadístico .....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
4.1. <i>Screening</i> de la concentración de agua de precocción de pota para el cultivo de la microalga <i>Chlorella</i> sp.....	39
4.2. Determinación de la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de la microalga <i>Chlorella</i> sp. en términos de biomasa y densidad celular en el agua de precocción del manto de pota .....	42
4.3. Determinación del factor de relación N/P del agua de precocción del manto de pota	49
4.4. Análisis de la variación de pH y parámetros abióticos, determinación de la concentración diaria, porcentaje promedio final de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos del agua de precocción del manto de pota por la microalga <i>Chlorella</i> sp. ....	50
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	61
VIII. ANEXOS .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química del agua de precocción del manto de pota .....	9
Tabla 2: Clasificación taxonómica de la especie <i>Chlorella</i> sp. utilizada en la investigación .....	25
Tabla 3: Características de las variables que se analizaron en el medio de precocción del manto de pota.....	28
Tabla 4: Valores promedio de los nutrientes iniciales en el agua de precocción de pota en la mezcla final de los cuatro lotes.....	30
Tabla 5: Resumen de las unidades experimentales en condiciones de invernadero para el desarrollo de la investigación .....	31
Tabla 6: Procedimiento para el cálculo de la relación N/P en el agua de precocción del manto de pota.....	36
Tabla 7: Valores de concentración de nitratos y densidad celular en el screening de la microalga <i>Chlorella</i> sp. en el agua de pota.....	40
Tabla 8: Recuento celular, Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento ( $\mu_2$ , calculada a partir de $\log_2$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu_2$ ) y tiempo duplicación (TD) de un cultivo de <i>Chlorella</i> sp., cultivada en medio enriquecido con Bayfolan (control) .....	43
Tabla 9: Recuento celular, Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento ( $\mu_2$ , calculada a partir de $\log_2$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu_2$ ) y tiempo duplicación (TD) de un cultivo de <i>Chlorella</i> sp., cultivada en medio de agua de precocción del manto de pota (1:1) .....	43
Tabla 10: Concentraciones iniciales de nitrógeno y fósforo calculadas, expresadas en mmol y relación N/P en el agua de precocción del manto de pota .....	49
Tabla 11: Valores obtenidos de los parámetros abióticos: pH, oxígeno disuelto (O.D.), temperatura (T) y salinidad, analizados en cada unidad experimental.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma del procesamiento del manto de pota congelado.....	8
Figura 2. Transformación del ATP hasta Hipoxantina en peces e invertebrados.....	11
Figura 3. Fases de crecimiento de un cultivo de microalgas. (1) Fase lag, (2) Fase de aceleramiento, (3) Fase exponencial, (4) Fase de desaceleración, (5) Fase estacionaria y (6) Fase de muerte.....	21
Figura 4. Imagen de la microalga <i>Chlorella</i> sp. (cepa IMP-BG 020).....	24
Figura 5. Instalaciones del Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).....	26
Figura 6. Densidades celulares de la microalga <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción del manto de pota bajo diferentes concentraciones (1:1 y 3:7), cultivo de <i>Chlorella</i> sp. y agua de precocción del manto de pota, respectivamente) en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).....	41
Figura 7. Concentración diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en los cultivos de <i>Chlorella</i> sp., bajo diferentes concentraciones en condiciones de invernadero.....	42
Figura 8. Crecimiento del cultivo <i>Chlorella</i> sp., en medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\blacktriangle$ ) y como suma progresiva de tasas de crecimiento ( $\blacksquare$ ).....	44
Figura 9. Crecimiento del cultivo <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL ( $\blacktriangle$ ) y como suma progresiva de duplicaciones celulares ( $\blacksquare$ ).....	45
Figura 10. Comparación de las densidades celulares de la microalga <i>Chlorella</i> sp. en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL ( $\blacktriangle$ ) y en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).....	46
Figura 11. Comparación de la biomasa seca de la microalga <i>Chlorella</i> sp. en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL ( $\blacktriangle$ ) y en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).....	47
Figura 12. Morfología de las células en el día 8 de tratamiento (40x). a) Cultivo de <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción de pota; b) Cultivo de <i>Chlorella</i> sp., en el medio enriquecido con Bayfolan puesta en la cámara de conteo.....	48
Figura 13. Comparación de las relaciones N/P en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo ( $\blacksquare$ ), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo ( $\blacktriangle$ ).....	50
Figura 14. Comparación de los valores de pH en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo ( $\blacksquare$ ), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo ( $\blacktriangle$ ) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).....	51
Figura 15. Promedio de concentración diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo ( $\blacksquare$ ), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo ( $\blacktriangle$ ) (Barras verticales indican variación del error estándar).....	54
Figura 16. Promedio de concentración diaria de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo ( $\blacksquare$ ), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo ( $\blacktriangle$ ) (Barras verticales indican variación del error estándar).....	55

Figura 17. Promedio de concentración diaria de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).....	57
Figura 18. Promedio de concentración diaria de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).....	58
Figura 19. Relación entre la densidad celular promedio y las densidades ópticas de <i>Chlorella</i> sp.....	73
Figura 20. Relación entre la biomasa seca promedio y las densidades ópticas de <i>Chlorella</i> sp. ....	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Estandarización de las ecuaciones de crecimiento celular para la microalga <i>Chlorella</i> sp.....	73
Anexo 2. Composición química del nutriente foliar líquido Bayfolan.....	75
Anexo 3. Distribución del screening para la determinación de la concentración adecuada del agua de precocción del manto de pota: a) Cultivo de <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción de pota, día 1; b) Cultivo de <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción de pota, día 4; c) Cultivo de <i>Chlorella</i> sp., en el agua de precocción de pota, día 7. ....	75
Anexo 4. Procedimiento para obtención de efluente de la precocción del manto de <i>Dosidicus gigas</i> “pota” y distribución del ensayo: (a) Manto de pota; (b) Precocción del manto; (c) Agua de precocción obtenido a partir del manto de pota; (d) Distribución final de los diferentes tratamientos del agua de precocción del manto de pota en condiciones de invernadero. ....	76

## RESUMEN

El agua de precocción de pota es un recurso muchas veces mal utilizado, desde su disposición como agua residual hasta su eliminación en cuerpos marinos receptores afectándolos negativamente. Esta agua contiene componentes solubles (p.ej., péptidos, nucleótidos, etc.) que pueden ser aprovechados en tratamientos de aguas mediante el cultivo de diversas especies de microalgas. La presente investigación tuvo como objetivo el análisis del crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. en el medio de cultivo obtenido a partir del agua de precocción del manto de pota. Se cuantificó la densidad celular mediante los métodos de conteo (cel/mL) y se calculó la biomasa seca en peso seco (mg/mL); Se utilizó la cepa de *Chlorella* sp. (IMP-BG-020) que fue cultivada en volúmenes de 7 L en una proporción 1:1 de cultivo microalgal y de agua de precocción del manto de pota durante 8 días, teniendo como variables evaluar la temperatura, pH, velocidad del crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación (TD) y la proporción de nutrientes (nitratos, nitritos, amonio y fosfatos) consumida. El cultivo de la microalga en el agua de precocción del manto de pota obtuvo una densidad celular y biomasa seca de  $81.07 \pm 7.12$  cel/mL  $\times 10^6$  y  $0.31 \pm 0.0173$  mg/mL, respectivamente. La concentración de nitratos se mantuvo constante, mientras que los valores de amonio se incrementaron hasta el final del experimento, sin embargo, todo lo contrario, ocurrió con las concentraciones de nitritos y fosfatos que se redujeron hasta en 55% y 43%, respectivamente; estando estos nutrientes relacionados al aumento de su densidad y biomasa. Por lo que se puede concluir que el agua de precocción del manto de pota preparado para esta evaluación al 50% es un medio adecuado para aprovecharlo en el cultivo de esta especie de *Chlorella*.

Palabras clave: *Chlorella* sp., pota, agua de precocción, medio de cultivo, crecimiento.

## ABSTRACT

Giant squid precooking water is a resource that is often misused, from its disposal as wastewater to its disposal in receiving marine bodies, affecting them negatively. This precooking water contains soluble components (e.g., peptides, nucleotides, etc.) that can be used in water treatments through the culture of various species of microalgae. This research aimed at the growth analysis of the microalgae *Chlorella* sp. in the culture media obtained from the precooking water of the squid mantle. Cell density was quantified by counting methods (cel/mL) and dry biomass was calculated by dry weight (mg/mL); the *Chlorella* sp. (IMG-BG-020) strain was used and it was cultivated in volumes of 7 L in a 1:1 ratio of microalgae culture and water of precooking of the mantle of giant squid for 8 days, taking as variables to evaluate the temperature, pH, speed growth ( $\mu$ ), doubling time (TD) and the proportion of nutrients (nitrates, nitrites, ammonia and phosphates) consumed. The culture of the microalgae in the precooking water of the squid mantle got a cell density and dry biomass of  $81.07 \pm 7.12$  cel/mL  $\times 10^6$  y  $0.31 \pm 0.0173$  mg/mL, respectively. The concentration of nitrates was constant, while the ammonium values increased until the end of the experiment, however in the other hand the concentration of nitrites and phosphates decreased in 55% and 43%, respectively; being this nutrients related to the increase of density and dry biomass. In conclusion the precooking water of the squid mantle prepared for this study at 50% is a suitable media to use in the culture of this *Chlorella* specie.

Keywords: *Chlorella* sp., giant squid, precooked water, culture media, growth

## I. INTRODUCCIÓN

La pota o *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) es un cefalópodo de distribución oceánica-nerítica de importancia comercial en el Pacífico oriental (Nigmatullin *et al.*, 2001; Rocha y Vega, 2003) y constituye para el Perú, el cefalópodo de mayor importancia económica que sustenta la pesquería artesanal e industrial desde el año 1991 (Mariátegui y Taipe, 1996).

En el Perú, es el recurso más capturado después de la anchoveta, en el 2017 el desembarque de la pota llegó a 295,975 toneladas métricas que equivale al 7.04% del total de desembarques realizados en ese año (Ministerio de la Producción, 2017). El destino de esta materia prima es principalmente para el consumo humano directo dividido en 4 tipos de productos: fresco, enlatado, congelado y curado; productos que en un 80% son exportados. Dentro de estos cuatro productos finales, el congelado de pota es el de mayor producción, con 251,882 toneladas que equivalen al 85.1% de todo el recurso capturado. Según datos del Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (2019) la pota congelada se ubica como un producto de exportación no tradicional e incrementó en 53.4% su valor de exportación en millones de dólares del 2018 al 2019, observándose de esta manera la importancia comercial para el país del recurso en cuanto a temas económicos respecta. Las principales industrias para el congelado de pota se encuentran ubicadas en el norte del Perú, en la provincia de Paita, región de Piura, es ahí donde se da el principal desembarque de pota para su procesamiento y posterior comercialización.

La comercialización de la pota en el Perú está orientada principalmente en el sector de congelados, siendo la región de Piura la que mayores industrias de pota tiene en este rubro (más de 30 empresas divididas en 3 sectores conocidos como Paita I, II y III). Estas industrias cuentan cada una con diferentes capacidades de producción que van de 7 hasta 350 TM/día (i.e. 125 TM/día para ARCOPIA S.A.) otorgadas por el ministerio de la producción. La industria dedicada al procesamiento de pota congelada realiza sus operaciones con uno de los recursos más importantes que es el agua potable, el cual es utilizado principalmente en el proceso de precocción del manto de pota. La producción de pota para congelado trae consigo diversas operaciones que generan residuos sólidos y líquidos. El agua es el elemento

más utilizado en este proceso, desde la limpieza hasta la precocción del manto de pota para su posterior congelación. El proceso de cocción al manto de pota tiene como finalidad reducir el porcentaje de agua, grasas y aceites para concentrar la proteína en el manto (Monterroso, 2011). Este proceso emplea cocinadores industriales de vapor indirecto, en forma de tinas con distintas canastillas sumergidas en agua potable en una proporción 1:2 (materia prima:agua) para la precocción de la materia prima. Esta operación se realiza por lotes de 500 a 750 kg del manto de pota en rangos de tiempo definidos (aproximadamente 15 minutos) y a temperaturas que oscilan entre 90 °C y 100 °C (Monterroso, 2011). El efluente producto de esta operación es eliminado de los cocinadores hacia canaletas provistas de trampas que retienen los sólidos más grandes, luego este efluente generado es mezclado con otros efluentes que vienen de diferentes procesos como el de limpieza de materia prima, equipos, etc. (Monterroso, 2011). La suma de todos estos efluentes mixtos es derivada hacia una poza de sedimentación y finalmente de acuerdo con cada autorización de vertimiento de efluentes otorgadas por la Autoridad Nacional del Agua (ANA), las plantas procesadoras vierten sus efluentes al alcantarillado de la red pública o son derivadas por alguna Empresa Prestadora de Servicios (EPS) a sus sistemas de tratamiento de agua o algunas plantas hacen la reutilización de sus aguas tratadas para riego de áreas verdes. Sin embargo, muchas plantas estuvieron realizando el vertimiento de sus aguas residuales hacia la bahía de Paita, generando contaminación en las playas de esta importante bahía (Monterroso, 2011).

Reforzando lo anterior, el efluente generado de la precocción del manto de pota contiene compuestos nitrogenados (aminoácidos libres, oligopéptidos, nucleótidos, bases orgánicas, etc.), no nitrogenados (ácidos orgánicos y azúcares) y componentes minerales, los cuales al no ser aprovechados generan demanda de oxígeno para su degradación (Ramirez-Suarez *et al.*, 2014). Es por eso que al ser estas aguas vertidas al mar o a cualquier cuerpo hídrico sin ser tratadas generan consumo de oxígeno afectando su disponibilidad para los peces y cualquier recurso acuático. Muchas veces incluso recibiendo las aguas residuales el tratamiento en planta, este no es efectivo, no cumpliendo muchas veces los límites máximos permisibles reportados en el DS-010-2018-MINAM para el caso de vertimiento al cuerpo receptor como aceites y grasas (350 mg/L) y sólidos suspendidos totales (700 mg/L), o los valores máximos admisibles reportados en el DS-010-2019-VIVIENDA para el caso de vertimiento de aguas no domésticas a la red de alcantarillado como aceites y grasas (100 mg/L), sólidos suspendidos totales (500 mg/L) y nitrógeno amoniacal (80 mg/L), regulados

por la legislación ambiental peruana (Monterroso, 2011). Algunos estudios como los desarrollados por Rosas-Romero *et al.* (2010) y Ramirez-Suarez *et al.* (2014) reportaron que este efluente posee compuestos relacionados con el sabor, los cuales pueden ser recuperados y utilizados por la industria alimentaria en la producción de productos derivados para el consumo humano, así como también potenciales nutrientes (nitratos, nitritos, fosfatos, etc.), originados por la desnaturalización de las proteínas y de otros compuestos presentes en este efluente y que pueden servir para el crecimiento de microalgas (Abdel-Raouf *et al.*, 2012; Romero, 2012; Ramos y Pizarro, 2018).

Según Abdel-Raouf *et al.* (2012), existen tecnologías convencionales para el tratamiento de este tipo de efluentes. El tratamiento preliminar es una de ellas, la cual busca remover los materiales sólidos más grandes (maderas, partículas de arena grandes, etc.) del efluente que puedan obstruir el flujo a través de la planta o dañar los equipos de tratamiento. Este tratamiento es seguido por el tratamiento primario, el cual consiste en pasar el efluente por tanques de sedimentación, los cuales pueden remover los sólidos sedimentables por gravedad. Luego, pasa por un tratamiento secundario que busca reducir la DBO ejercida por la materia orgánica, esto es realizado por una población mixta de bacterias que utilizan la materia orgánica como fuente de energía y crecimiento. El tratamiento terciario busca remover todos los iones orgánicos por la vía biológica o química; avanzados tratamientos terciarios pueden remover amonio, nitratos, fosfatos, etc., pero esto puede costar hasta 4 veces más que un tratamiento primario (De la Noüe *et al.*, 1992). Según cálculos realizados por Monterroso (2011) se reportó aproximadamente 10,919 m<sup>3</sup>/mes de efluente, sin considerar el agua resultante por pérdida del proceso de evaporación, generado por la industria de congelado solo en la ciudad de Piura, representando un problema para la industria debido a que su tratamiento es costoso; Park *et al.* (2001) menciona hasta 7 tipos de tecnologías utilizadas para el tratamiento de este efluente (tratamiento biológico anaeróbico, tratamiento con ozono, flotación de aire disuelto, tratamientos químicos, etc.), tecnologías que en su mayoría son costosas llegando a costar para el caso del tratamiento con ozono hasta 190,000 dólares con un costo de operación anual de 40,000 dólares y además de eso también está el factor contaminación ya que el vertimiento de este efluente contaminaría las áreas a su alrededor si son descargadas al mar por efecto de la eutrofización, como ya se ha reportado en la bahía de Paita donde muchas de estas plantas operan (Monterroso, 2011).

El uso de efluentes de diferentes tipos de industrias para el aprovechamiento de nutrientes y remoción de algunos contaminantes por parte de las microalgas se realiza desde hace varios años en otros países con buenos resultados (Andersen, 2005; Andrade, 2008; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Algunos de los beneficios de utilizar microalgas para el tratamiento de efluentes es que no generan otra fuente de contaminación, como podría ser el caso de un tratamiento químico y tienen un efecto desinfectante debido al incremento del pH al producir oxígeno durante la fotosíntesis (De la Noüe y De Pauw, 1988). En respuesta a estos problemas en el tratamiento de este tipo de efluentes (costos y contaminación) se han venido desarrollando diferentes estudios con varias especies de microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina*, etc. (Abdel-Raouf *et al.*, 2012; Aslan y Kapdan, 2006). Sin embargo, la especie *Chlorella* sp. es de gran interés científico y comercial debido a la capacidad que tiene para absorber y asimilar rápidamente el dióxido de carbono y los nutrientes de los efluentes; así como por su alta tasa de crecimiento, competitividad y tolerancia a una gran variedad de condiciones ambientales resulta ser un buen organismo experimental (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Tales características la convierten en una buena opción para el aprovechamiento de los nutrientes presentes en el agua de precocción del manto de pota.

Es así que el presente estudio se planteó con el objetivo general de evaluar el aprovechamiento del agua de precocción generado en el procesamiento de congelado del manto de pota como medio de cultivo para la microalga *Chlorella* sp.; y como objetivos específicos se planteó realizar un *screening* que permita determinar la mejor concentración de esta agua de pota a utilizar para el cultivo de la microalga *Chlorella* sp., determinar la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de la microalga *Chlorella* sp. en términos de biomasa y densidad celular en el agua de pota y determinar la concentración diaria y porcentaje final de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos en el agua obtenida por efecto del cultivo de la microalga *Chlorella* sp. en el agua de pota.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

La pota *D. gigas* es una especie nerítica oceánica de amplia distribución en el Pacífico este, desde Baja California (México) hasta Chile, habiendo ampliado su extensión en ambos hemisferios después de El Niño 1997-1998. Como las demás especies de calamares es un recurso de vida corta, semélparo (desovan una vez y mueren) oportunistas, que responden rápidamente a cambios ambientales (Nigmatullin *et al.*, 2001, Boyle y Rodhouse, 2005).

Un importante sector de la flota artesanal e industrial peruana está concentrado en su captura debido a su alto contenido proteico, acumulando una captura total desembarcada hasta el mes de setiembre del 2019 de aproximadamente 422,388 TM (IMARPE, 2019). Luego de su captura, la pota es recepcionada en las instalaciones de la planta donde es eviscerada y fileteada, luego pasa por un primer lavado cuyo objetivo es el de eliminar posibles restos de la operación previa; el manto de la pota luego es expuesto a diversos tratamientos para realizar diferentes productos; uno de los tratamientos más comunes aplicados al músculo de la pota es la precocción (Monterroso, 2011). El agua usada para este proceso es eventualmente transformada en un efluente, también considerado como “agua residual”, a pesar del contenido de nutrientes que pueden ser aprovechados.

### 2.1. Clasificación taxonómica de la pota

Phylum: Mollusca

Clase: Cephalopoda

Orden; Oegopsida

Familia: Ommastrephidae

Género: *Dosidicus*

Especie: *Dosidicus gigas* (d’Orbigny, 1835)

Es una especie que realiza migraciones por alimentación y reproducción, encontrándose en las zonas del Pacífico Central y Sur Oriental desde el Golfo de California hasta Chile (Nigmatullin *et al.*, 2001). Tiene un aspecto casi idéntico al calamar con el que suele confundirse y, por ello, recibe el nombre de “calamar gigante”; teniendo otros nombres comunes como: jibia, calamar volador, jumbo squid.

Al igual que otras especies de calamar, la pota tiene un crecimiento somático rápido, ciclo de vida corto con un máximo de dos a tres años (Csirke *et al.*, 2018). Es por esto que la pesca

de esta especie debe ser a los seis meses de edad. Esta especie presenta altas tasas de crecimiento, con tallas registradas de especies adultas que son clasificadas en: pequeñas (130-340 mm), medianas (240-600 mm) y grandes (mayores de 550 mm). Se estima que la tasa promedio de crecimiento mensual es de 6 cm durante el primer año de vida y de 2 cm mensuales, en el segundo año de vida (Csirke *et al.*, 2018). La pota es un organismo monocíclico, es decir, se puede reproducir una sola vez en su vida (Monterroso, 2011).

## **2.2. Volúmenes de producción en las diferentes modalidades**

Actualmente en el Perú, la pota es la principal especie en la pesquería artesanal peruana desde el 2000 (PROMPERÚ, 2018). La extracción comercial de este recurso se da principalmente para la elaboración de diversos productos como conservas, congelados y harina, es así que los volúmenes exportados de conservas han ido en incremento desde el 2014, llegando a reportarse 700 toneladas en el 2018 siendo los países preferidos Estados Unidos, Rusia y Corea del Sur; de otro lado, los volúmenes de exportación reportados de harina de pota han sido variables en los últimos años llegando el 2018 a 6,000 toneladas aproximadamente y que dentro de sus principales destinos se encuentran Ecuador, Japón y España; mientras que los volúmenes de exportación para los filetes precocidos de pota superan ampliamente a los de conservas y harina llegando el 2018 a reportarse aproximadamente 30,000 toneladas siendo sus principales destinos Corea del Sur, China y Japón (PROMPERÚ, 2018). De acuerdo con los datos reportados por Monterroso (2011), el número de plantas dedicadas al procesamiento de congelado de pota precocida, con licencia de operación proporcionada por la Dirección Regional de Producción (DIREPRO - Piura) es de 27 plantas las cuales cuentan en total con una producción estimada de 6,921 TM/mes, esto solo en Piura. Según los cálculos realizados por Monterroso (2011), la generación de esta agua de precocción sería de aproximadamente de 10,919 m<sup>3</sup>/mes. Estos números reflejan la necesidad del tratamiento o uso de esta agua que contienen muchos componentes que pueden ser aprovechados.

## **2.3. Composición proximal del manto de la pota**

La fracción de agua en el manto de pota es de aproximadamente 75 a 80%; la fracción de proteína cruda es de 16 a 21%, lípidos es aproximadamente 1% y la fracción de minerales es de 1 a 2%. Hay algunas variaciones dependiendo de las especies. La composición proximal puede variar dependiendo si se hace el análisis al manto con y sin la epidermis,

sobre todo en la fracción de ácidos grasos ya que la epidermis contiene más lípidos que el manto (Salvo, 2016).

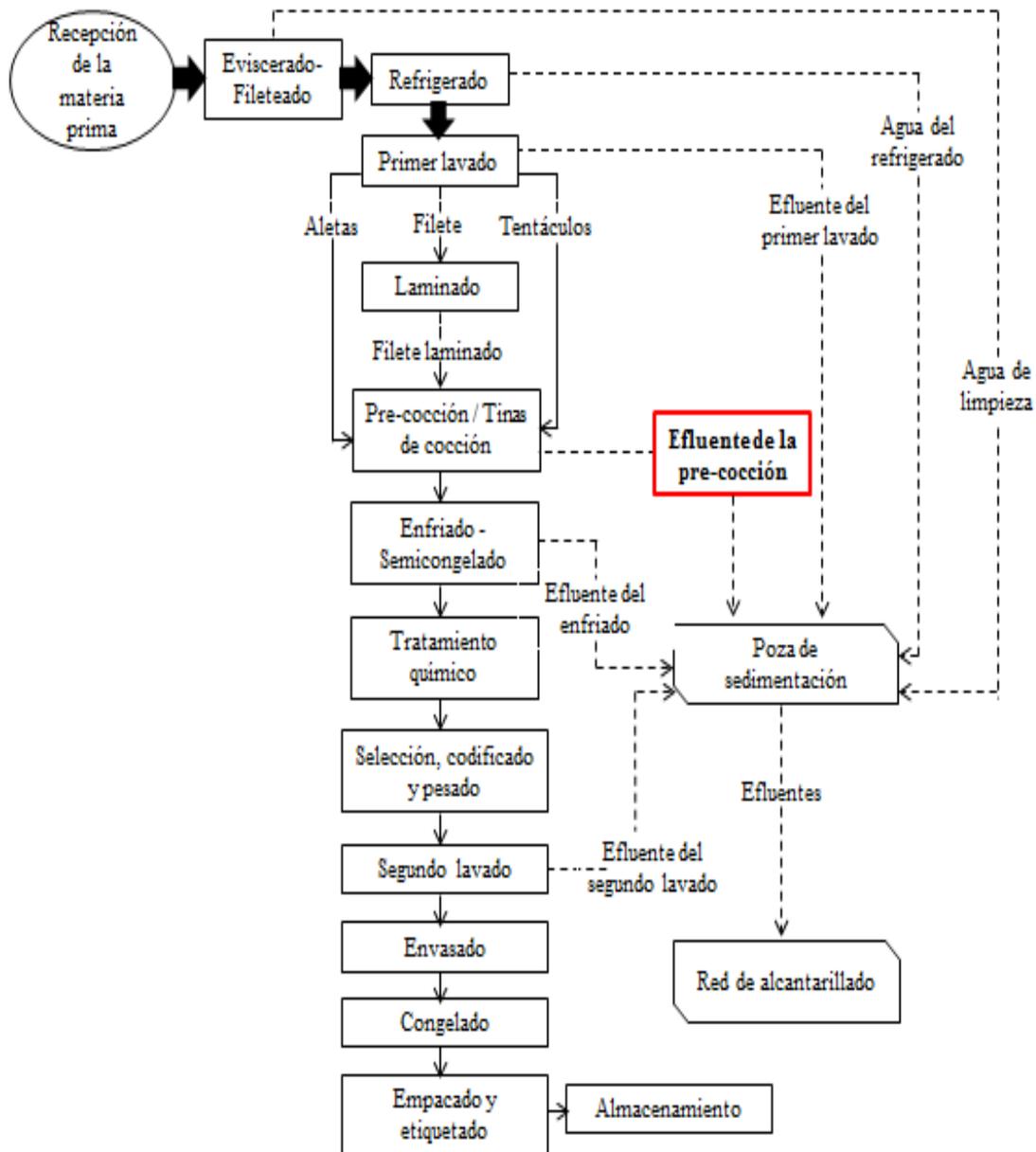
La fracción proteica es de aproximadamente 20%. Esta proteína puede ser ampliamente categorizada en proteínas miofibrilares compuesta por miofibrillas similares a las proteínas en los músculos de otros animales, proteínas sarcoplasmáticas las cuales llenan los espacios de las miofibrillas y músculos basados en la composición de proteínas de los tejidos conectivos. Se ha reportado que la proteína de base muscular en la que se encuentran muchos de los nutrientes que pueden ser aprovechadas por las microalgas y que se encuentran en el agua de precocción de pota (Salcedo, 2015) .

La composición de lípidos es muy baja, aproximadamente 1%. Dentro de esa proporción se pueden encontrar ácidos grasos y esterol (Salvo, 2016).

#### **2.4. Procesamiento del manto de pota congelado**

El procesamiento del manto de pota congelado realizado en la mayoría de las plantas industriales ubicadas en Piura se describe en la figura 1. Esta operación de precocción se inicia con la recepción de la materia prima en cámaras isotérmicas con bloques de hielo en su interior que luego es eviscerada y fileteada para después ser lavada; El proceso de cocción se realiza en tinas de acero inoxidable con capacidad de hasta 800 kg y por lotes en rangos de tiempo definidos (aproximadamente 15 minutos) y a temperaturas que oscilan entre 90 °C y 100 °C (Monterroso, 2011), esta operación empieza cuando la tina de cocción se llena de agua hasta el tope y con la ayuda de un brazo mecánico la canastilla llena de pota es colocada dentro de la tina correspondiente. Luego de haber cocinado varias canastillas en la misma tina, se procede al cambio de agua. Para ello, la tina en la parte inferior tiene un tubo de escape regulado por un timón para la eliminación de dicha agua utilizada en la precocción. Así el efluente es vertido hacia unas canaletas con rejillas para la retención de algunos sólidos y luego conducido hacia unas pozas de sedimentación para su posterior tratamiento, ser vertidos a la red de alcantarillado o ser dispuestos de otras formas. Posteriormente el filetes de pota son enfriados y semicongelados, el enfriamiento se realiza con agua fría a 0 °C, por un tiempo de 10 min., mientras que la segunda operación consiste en sumergir los filetes en agua fría y hielo más la adición de salmuera por un tiempo de 5 minutos. Luego de este proceso los filetes pueden pasar por un tratamiento químico cuyo objetivo consiste en reducir los niveles de acidez de la pota, después de esto los filetes son seleccionados,

codificados y pesados. Posteriormente pasan por un segundo lavado en el cual usan agua clorada (0.5 - 2 ppm) y a temperatura de 0 °C, luego pasa al envasado en donde los filetes son colocados en bandejas metálicas con láminas de polietileno y ubicadas luego en *racks* que entran a los túneles de congelación donde mantienen una temperatura de -30 °C por un tiempo de 15 a 18 horas. Finalmente, el producto es empacado, etiquetado y almacenado para su posterior exportación (Monterroso, 2011).



**Figura 1. Flujograma del procesamiento del manto de pota congelado.**

**Fuente: Tomado de Monterroso, 2011.**

## 2.5. Composición química del agua de precocción del manto de pota

Esta agua se origina como consecuencia de la cocción del manto de pota en tinajas, con el objetivo de restarle agua, grasas, aceites, etc. a la materia prima y concentrar su mayor valor proteico, para su posterior congelado. Este efluente está formado por agua, residuos sólidos, partes externas de pota, proteínas, grasas, aceites de pota disueltos, sales, etc. (Monterroso, 2011).

La tabla 1 presenta la composición química de esta agua según los resultados reportados por Monterroso (2011).

**Tabla 1: Composición química del agua de precocción del manto de pota**

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Efluente de pota precocida</b>
<b>DBO<sub>5</sub></b>	mg/L (O <sub>2</sub> )	8,500
<b>DQO</b>	mg/L (O <sub>2</sub> )	9,609
<b>Fósforo total</b>	mg/L (P)	382
<b>Nitrógeno total</b>	mg/L (N)	2,177
<b>Sólidos totales</b>	mg/L	16,449
<b>Sólidos suspendidos totales (SST)</b>	mg/L	259
<b>Cloruros</b>	mg/L (Cl <sup>-1</sup> )	2,859

Fuente: Tomado de Monterroso, 2011.

Cuando los alimentos son puestos en contacto con agua caliente, muchos componentes se separan de ellos, esto mismo pasa en la precocción del manto de pota. Grupos de componentes incluyendo a las proteínas de altos pesos moleculares y péptidos, vitaminas hidrosolubles, polisacáridos y minerales, que son llamados “componentes extractivos”. Así como también elementos trazas, existen cerca de 100 diferentes componentes extractivos. Estos pueden ser ampliamente divididos en componentes nitrogenados (componentes que incluyen nitrógeno en su estructura química) y componentes no nitrogenados (Rosas-Romero et al., 2010). Por otro lado, los componentes minerales, son algunas veces incluidos dentro de los componentes extractivos, debido a que el sodio y potasio (iones positivos) y el cloro y ácido fosfórico (iones negativos) son conocidos por tener un rol importante al reaccionar con los aminoácidos (Ramirez-Suarez *et al.*, 2014).

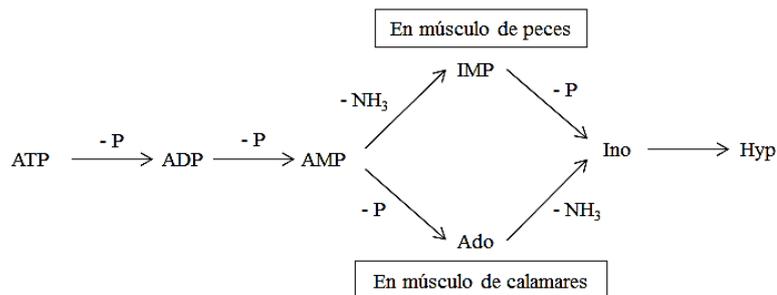
Los aminoácidos libres presentes en tejidos musculares varían entre diferentes tipos de moluscos, Konosu y Yamaguchi (1982) reportó que el contenido de glicina en conchas de

abanico es de 1,455 mg/100g de músculo comparado con 10 mg/100g de músculo de pota. Sin embargo, los aminoácidos predominantes en el músculo de pota son taurina, prolina, glicina, alanina y arginina (Shirai *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2014).

Shirai *et al.*, (1997) reportó los aminoácidos que se encontraban presentes en el músculo del manto del calamar del pacífico de Borneo como treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, arginina y prolina, entre otros componentes activos que están relacionados al sabor presente en la pota. Además, Konosu (1979) reportó los mismos aminoácidos (con excepción del ácido glutámico y treonina) que son los responsables de impartir el sabor de tres tipos de especies de calamares (*Loligo chinensi*, *L. kensaki* y *Sepioteuthis lessonianan*). De acuerdo con el estudio realizado por Rosas-Romero *et al.* (2010), el músculo del manto de pota contiene histidina, taurina, arginina, alanina y metionina, aminoácidos reportados también por Oliveros (2017) en el músculo del manto de calamar.

La presencia de carbohidratos en el efluente del manto del pota también fue objeto de estudio por Rosas-Romero *et al.* (2010), en el cuál reportó que la operación de cocción de la pota promovió la rápida degradación de carbohidratos lo cuál se vio reflejado en el bajo contenido de carbohidratos en el efluente.

El número de nucleótidos de bajo peso molecular como ingrediente biológico excede el 100%. Los nucleótidos de bajo peso molecular en el músculo de animales son principalmente nucleótidos de adenina que son los precursores de la formación de ATP (Arai y Saito, 1961). En los peces, el ATP decrece rápidamente en el músculo luego de morir y el ácido inosínico (IMP) se acumula vía adenosin difosfato (ADP) y adenosin monofosfato (AMP). Esto se da debido a que el AMP bajo una desaminación por parte de la enzima AMP desaminasa en los músculos, es por eso que se transforma a IMP, pero la acción de la enzima la cual remueve el ácido fosfórico del IMP es débil. A diferencia del caso de los invertebrados marinos (figura 2) como los calamares, pulpos, conchas de abanico, etc., AMP en el músculo bajo una desfosforilación, varían según las especies, formando adenosin (Ado), seguido por una descomposición en inosin (Ino) debido a la fuerte acción de la enzima adenosin desaminasa y el IMP es producido idénticamente como en el caso de otros moluscos como langostinos y cangrejos (Sugiyama *et al.*, 1989).



**Figura 2. Transformación del ATP hasta Hipoxantina en peces e invertebrados.**

**Fuente: Tomado de Sugiyama *et al.*, 1989.**

Algunos estudios han indicado que los productos de la degradación del ATP son considerados como precursores del sabor, contribuyendo directamente a la calidad sensorial de los productos hidrobiológicos (Kassemsarn *et al.*, 1963; Boyle *et al.*, 1991). En el estudio realizado por Rosas-Romero *et al.* (2010), se reportaron concentraciones altas de hipoxantina y bajas concentraciones de adenosin monofosfato (ADP) en el efluente de pota caracterizado, esto corroboraría la alta lixiviación de estos componentes del músculo hacia el efluente.

Hatagoshi (1989), analizó los mantos de una especie de calamar para obtener las concentraciones de componentes inorgánicos y los resultados indicaron que el manto del calamar contiene más óxido de potasio (K<sub>2</sub>O) y óxido de sodio (Na<sub>2</sub>O) que el óxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>).

El mercurio (Hg) ha sido detectado en calamares (Nozaki y Miyahara, 1974), pero las medidas fueron por debajo de los niveles permisibles de acuerdo con la legislación japonesa (mercurio total de 0.4 ppm). Adicionalmente otros metales fueron reportados como sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), etc. El contenido de Cu en el músculo de algunos calamares es generalmente más alto que en peces, debido a la presencia de la proteína hemocianina (Sugiyama *et al.*, 1989).

## **2.6. Utilización de microalgas en la remoción de nutrientes**

Los cultivos de microalgas para la remoción de nutrientes en los efluentes son una solución interesante debido a la habilidad de las microalgas para usar nitrógeno inorgánico y fósforo (en forma de ortofosfatos) para su crecimiento y también por su capacidad para remover metales pesados y componentes orgánicos tóxicos (Abdel-Raouf *et al.*, 2012), mientras que el efluente puede ser vertido al cuerpo marino receptor, claro está, cumpliendo con los límites

máximos permisibles que la legislación peruana obliga (DS-011-2018-MINAM). O como también el efluente tratado puede ser utilizado para su reúso de acuerdo con lo que cada industria disponga.

### **2.6.1. Sistemas de cultivo**

#### **a. Tipos de cultivos**

Existen tres tipos de métodos a escala comercial de cultivo de microalgas, dependiendo de cómo opere el sistema: cultivo discontinuo (*batch*), cultivo semi-continuo y cultivo continuo.

##### **- Cultivos Discotinuos**

También llamados cultivos *batch*. En estos cultivos, la población va pasando por las distintas fases de crecimiento (latencia, exponencial, estacionaria), ajustándose generalmente a una función logarítmica. Estos cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular (Albalde *et al.*, 1995).

##### **- Cultivos Semi-continuos**

En este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se transfiere a un tubo o recipiente que contenga medio de cultivo recién formulado. De esta forma se provee a las microalgas con los nutrientes que necesita y no se registra una fase de adaptación pronunciada (Andersen, 2005).

##### **- Cultivos Continuos**

En este cultivo, se mantiene la población en fase exponencial de crecimiento durante largos periodos de tiempo. Para ello se debe añadir continuamente nutrientes en la misma medida en que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y la población celular a nivel constante (Andrade, 2008).

### **2.6.2. Medios de cultivo**

En su hábitat natural, las microalgas obtienen todos los nutrientes que requieren del agua en la que viven. Pero, en los cultivos realizados en laboratorio es necesaria la adición de

nutrientes que permitan su crecimiento. Los tipos de nutrientes y la proporción en la que se adicionan se conocen como medios de cultivo (Albalde *et al.*, 1995).

Existe una gran variedad de medios de cultivo; siendo la mayoría basados en la composición de los nutrientes presentes en los cuerpos de aguas naturales (océanos, lagos, etc.), así como la composición de nutrientes presentes en las microalgas (Andersen, 2005).

Los medios de cultivo utilizados para microalgas pueden ser agrupados en las siguientes categorías:

- **Medios enriquecidos usando aguas naturales**

Estos medios son preparados agregando nutrientes de fuentes de aguas naturales, provenientes de lagos, lagunas, aguas marinas, entre otros. El enriquecimiento con diferentes nutrientes químicos si bien aumenta enormemente la velocidad de crecimiento y biomasa máxima de los cultivos de microalgas, existen algunas desventajas como por ejemplo el no conocer la composición exacta de estos medios, ya que estas fuentes naturales poseen una gran cantidad de compuestos desconocidos (Andersen, 2005).

- **Medios de cultivo sintético (artificiales)**

Están diseñados principalmente para proporcionar medios definidos, tanto para cuidadosos experimentos, estudios y mantenimiento rutinario de cepas. Por mencionar algunos de estos medios tenemos al Bold basal, BG-11, CHU #10, Guillard f/2, etc. (Andersen, 2005).

- **Medios orgánicos**

Estos tipos de medios se basan en la adición de suplementos orgánicos como la harina de pescado, de soya, humus de lombrices, ensilado de pescado, entre otros. Según Andrade (2008), efluentes domésticos tratados y otras formas de aguas residuales, como efluentes de granja de peces, entre otras son utilizados como fuente de nutrientes y según algunas investigaciones, estos medios de cultivo pueden producir en mayor o menor medida las mismas tasas de crecimiento que los medios de cultivo sintéticos (Andrade, 2008; Romero, 2012; Salgueiro, 2018).

### **2.6.3. Métodos de conteo en microalgas**

El conteo de células de microalgas en cultivos tiene dos principios de aplicación. El primero es para estimar el tamaño de la población cultivada y la segunda aplicación está en la estimación de la tasa de aumento en el cultivo, para esto existen métodos prácticos como el uso de microscopios y dispositivos de conteo (cámara de Sedgwick-Rafter, Hemocitómetro o cámara de Neubauer, etc.) que nos permiten obtener los valores de microalgas en un determinado cultivo expresados en unidades cuantificables (cel/mL, mg/mL, etc.) (Andersen, 2005).

Existen varios métodos para el conteo de microalgas desde el empleo de espectrofotómetros, fluorómetros, contadores tipo Coulter y hemocitómetros.

#### **- Los espectrofotómetros o fluorómetros**

Miden el contenido en la clorofila “a” en el cultivo de microalgas y esta información se puede utilizar para obtener una rápida aproximación de la densidad celular (mg/mL). Se recomienda preparar gráficos que comparen la densidad celular y las lecturas en cada instrumento para cada especie de microalga. Sin embargo, el contenido en clorofila “a” de una célula de microalga no es constante y varía según el estado alimenticio de la célula. Esto afectará a la exactitud de los cálculos de conteo con estos instrumentos (FAO documento técnico de pesca 471, 2006).

#### **- Contadores tipo Coulter**

Este instrumento también llamado Multisizer se desarrolló en un principio para hemogramas. Existen varios modelos y todos funcionan siguiendo el mismo principio, en el que una corriente eléctrica pasa entre dos electrodos y cada vez que pasa una célula entre ellos, se obstruye la corriente y se recuenta la célula. El tamaño del tubo de abertura es importante y para el recuento de células de microalgas de 2 a 10  $\mu\text{m}$  se necesita una abertura de 50 ó 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (FAO documento técnico de pesca 471, 2006).

#### **- Los hemocitómetros**

Son un portaobjetos de cristal grueso con dos cámaras en la superficie superior. La cámara que se utiliza con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el hemocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de nueve cuadros con lados de

1 mm (área total de recuento =  $0.9 \text{ mm}^2$ ) cada uno de los cuales corresponde a un volumen de  $0.1 \text{ }\mu\text{L}$ . Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de  $0.04 \text{ mm}^2$  ( $0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$ ), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Arredondo y Voltolina, 2007).

Este tipo de cámara es utilizado junto al microscopio; una de las desventajas para el recuento en microscopio es obtener una buena reproducibilidad, por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara.

#### **2.6.4. Requerimientos nutricionales para la producción de microalgas**

Las microalgas necesitan para su crecimiento nutrientes como el nitrógeno (bajo sus diferentes formas), fósforo, potasio, magnesio, etc.; además de fuentes de carbono (bajo la fijación de  $\text{CO}_2$ ), minerales y vitaminas. En función de las cantidades requeridas estos compuestos se agrupan en macronutrientes y micronutrientes (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Esto incide en la velocidad del crecimiento y en la composición bioquímica de las células de cultivo; igualmente, los requerimientos nutricionales varían según cada especie y depende de las condiciones abióticas (luz, temperatura, pH, etc.) en las que se desarrolle el cultivo (MAGRAMA, 2013).

Los principales nutrientes que determinan la productividad de las microalgas son los siguientes:

##### **Nitrógeno**

El contenido en nitrógeno de la biomasa microalgal puede suponer desde un 1% hasta más del 10% en peso seco, en función de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas pueden incorporar el nitrógeno del medio generalmente en forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), así como también en forma de péptidos, aminoácidos y purinas (Perez-García *et al.*, 2011).

En medios de cultivo sintéticos, el nitrógeno es usualmente adicionado en la forma de sales de amonio o nitratos; ya que, estas son las principales formas de nitrógeno que utilizan las microalgas. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía,

resultando más favorable para las microalgas utilizar el amonio cuando este está disponible (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva a un incremento de la abundancia de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico no siempre generan una mayor abundancia; al contrario, puede causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes (Camargo y Alonso, 2006).

La tolerancia al amonio depende de la especie cultivada; por ejemplo, *Spirulina platensis* se ve prácticamente inhibida ante concentraciones de 200 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, mientras que *Chlorella sorokiana* no muestra inhibición ante concentraciones de 400 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L (MAGRAMA, 2013).

### **Fósforo**

El fósforo juega un rol importante en la mayoría de los procesos celulares, especialmente en los procesos metabólicos implicados en la generación y transformación de energía (Andersen, 2005).

El fósforo total que se presenta en el medio acuático consiste en fosforo inorgánico disuelto, compuestos orgánicos de fósforo disuelto y fósforo orgánico en partículas suspendidas (Andersen, 2005). Sin embargo, mientras que el nitrógeno puede ser utilizado por las microalgas bajo sus diferentes formas; el fósforo debe ser asimilado casi exclusivamente en forma de ortofosfatos (P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), y es la concentración de este compuesto la que determina la velocidad de crecimiento y la máxima biomasa que podrán alcanzar las microalgas.

La disponibilidad del ortofosfato depende mucho del pH, ya que este parámetro le permite mantenerse en equilibrio con las otras formas de fosfato (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Factores como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio, hacen lenta la toma de fosfatos por parte de las microalgas (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

#### **2.6.5. Remoción de nitrógeno y/o fósforo por las microalgas**

El biotratamiento de aguas residuales con microalgas para la remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo y para proveer oxígeno para las bacterias aeróbicas fue propuesto hace más de 50 años atrás por Oswald *et al.* (1852).

Las aguas residuales son mayormente tratadas por degradación biológica aeróbica o anaeróbica; sin embargo, el agua tratada aún contiene componentes inorgánicos como los nitratos, amonio e iones de fosfato, los cuales generan eutrofización en lagos y causa *blooms* microalgales nocivos. Taylor (1949) y Geddes (1984) consideraron al fósforo y nitrógeno como las llaves de la eutrofización. Por eso es necesario el tratamiento de aguas contaminadas para prevenir la eutrofización.

Singh *et al.* (2017) estudio la habilidad de *Chlorella vulgaris* en la remoción de nutrientes, reportando una eficiencia de remoción de 87.9% para nitrógeno total y 98.4% para fósforo total. Mayhead *et al.* (2018) reportó una remoción de amonio (94.18%) y ortofosfatos (97.69%) en el tratamiento de aguas residuales domésticas filtradas con membranas.

El interés en el cultivo de microalgas viene del hecho que los procesos de tratamientos convencionales sufren de importantes desventajas: (a) requerimiento de espacios para el cultivo; (b) efectos en las características del agua de tratamiento; (c) influencia de las condiciones ambientales y operacionales; y (d) cosecha de la biomasa y su valorización (Molinuevo-Salces *et al.*, 2019). La última desventaja es uno de los mayores desafíos para la producción a mayor escala de microalgas en sistemas de tratamiento, siendo entre 20 y 30% del total de los costos de operación (Vandamme *et al.*, 2013).

También, los nitritos son importantes como precursores de los componentes nitrosos, principalmente nitrosaminas, las cuales han recibido considerable atención debido a sus posibles propiedades cancerígenas, teratogénicas y mutagénicas (Krauss, 2009). Debido a que los nitratos no son removidos significativamente por tratamientos de agua convencionales, investigaciones están siendo concentradas en el desarrollo de nuevas técnicas para reducir nitratos en agua potable hasta niveles tolerables, p. ej. < 50 mg/l (World Health Organization, 2011). Mientras, que para los tratamientos de efluentes el uso de microalgas se centra en su habilidad de remover efectivamente y a bajo costo el exceso de estos nutrientes y otros contaminantes que son las causas de la eutrofización y contaminación de las aguas residuales (Andrade, 2008).

#### **2.6.6. Relación nitrógeno-fósforo (N:P)**

Diversas investigaciones han demostrado que además de la disponibilidad de los nutrientes, la relación en la que estos se encuentran influye en el correcto crecimiento de las microalgas,

siendo la proporción nitrógeno y fósforo (N:P) la más importante (Stevenson *et al.*, 1996; Andersen, 2005).

Las microalgas utilizan el nitrógeno y fósforo para producir incrementos de biomasa, debido a que ambos elementos son esenciales para esto, la remoción de un nutriente depende de la disponibilidad del otro; en otras palabras, las microalgas ni pueden absorber nitrógeno sin la presencia de fósforo, o viceversa (Andersen, 2005; Beuckels *et al.*, 2015).

La relación de Redfield es uno de los criterios estequiométricos más utilizados en el campo de la ecología acuática; ya que explica que, en grandes rasgos, una proporción molar de carbono, nitrógeno y fósforo de 106:16:1 brinda el balance necesario para que ninguno de estos nutrientes se encuentre de forma limitante y su asimilación sea máxima (Andersen, 2005; Beuckels *et al.*, 2015). Pero, se ha demostrado que esta relación no es fija para todas las microalgas, especialmente en las especies de agua dulce (Beuckels *et al.*, 2015). Por ejemplo, Beuckels *et al.*, (2015) investigó el efecto de la relación N:P sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, determinando como óptima la relación 15:42. Esto indica que relaciones N:P por debajo de 15:42 tendrán como limitante al fósforo; mientras que en relaciones mayores a 15:42, el limitante será el nitrógeno.

#### **2.6.7. Factores que afectan el crecimiento microalgal y la remoción de nutrientes**

El crecimiento microalgal y el consumo de nutrientes no solo son afectados por la disponibilidad de los nutrientes, estos también dependen de interacciones complejas entre factores físicos como el pH, intensidad de luz, temperatura (Talbot y De la Noüe, 1993), y factores bióticos. El primer factor biótico significativo de influencia en el crecimiento algal es la densidad inicial, es esperado que mayor sea la densidad de algas, cuanto mejor sea el crecimiento y la alta eficiencia de remoción de los nutrientes. Sin embargo, la alta densidad algal puede ocasionar el auto sombreado y la acumulación de autoinhibidores, por lo tanto, la reducción en la eficiencia de la fotosíntesis (Beltrán, 2014).

#### **Temperatura**

Este factor abiótico afecta las reacciones celulares, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición química, así como la producción y composición bioquímica de las algas (Arroyo, 2016).

El rango óptimo de temperatura para el crecimiento de la mayoría de las microalgas en cultivo se sitúa entre los 15 y 22°C (Tenorio *et al.*, 2018); sin embargo, la tolerancia a la temperatura varía según la especie, es así como especies sensibles como *Isochrysis*, no soportan temperaturas superiores a los 25°C, mientras que formas más resistentes como *Chlorella* crecen bien hasta los 36°C (Stevenson *et al.*, 1996).

## **pH**

Las microalgas en cultivo dependen del pH del medio, siendo que cada especie requiera un pH óptimo para su cultivo, valor que generalmente se encuentra en un rango de 7-9. Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH hasta cierto límite (Andrade, 2008; MAGRAMA, 2013).

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies como en la del equilibrio químico del CO<sub>2</sub>, y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. El proceso fotosintético de fijación de CO<sub>2</sub> provoca un aumento gradual del pH en el medio debido a la acumulación de OH<sup>-</sup>, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por difusión a la atmosfera y la eliminación de fosforo por precipitación de ortofosfatos (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017).

### **2.7. Cinética del crecimiento de las microalgas**

En microbiología, el crecimiento se define como un incremento en el número de células o de la masa celular de una población. De la misma manera que en bacterias y levaduras, las microalgas se reproducen principalmente por división celular binaria; en la cual, una célula duplica su carga genética y posteriormente se divide, dando lugar a dos células hijas (Madigan *et al.*, 2004). Debido a esto, la gran mayoría de análisis sobre el crecimiento en microalgas utilizan el modelo de crecimiento exponencial, como se muestra a continuación (Arredondo y Voltolina, 2007):

$$N_t = N_0 \times e^{rt}$$

En donde:

N<sub>t</sub>: Densidad celular (cel/mL) en el tiempo (h).

N<sub>0</sub>: Densidad celular inicial (cel/mL).

r: Velocidad intrínseca de crecimiento (día<sup>-1</sup>).

t: Intervalo de tiempo (h).

Siguiendo este modelo, la velocidad de crecimiento es definida como el cambio de número de células o de la masa celular por intervalo de tiempo ( $\Delta t$ ). Andersen (2005) menciona que la velocidad intrínseca de crecimiento ( $r$ ) es igual a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) cuando la mortalidad es 0, como se observa en la siguiente ecuación:

$$r = \mu = \frac{\text{Ln}(N_t) - \text{Ln}(N_0)}{\Delta t}$$

Sin embargo, el crecimiento poblacional se encuentra limitado por los nutrientes presentes en el ambiente y factores que limitan el crecimiento, como la luz o el pH (González, 2010).

Arredondo y Voltolina (2007) describen que la función que representa el crecimiento las microalgas en ambientes limitantes se ve representada en una curva logística de la siguiente forma:

$$N_t = \frac{K}{1 + e^{a-r}}$$

Donde:

$N_t$ : Densidad celular (cel/mL) en el tiempo (h).

K: Capacidad de carga o densidad celular máxima alcanzada (cel/mL).

r: Velocidad de crecimiento intrínseco ( $\text{h}^{-1}$ ).

t: Tiempo (h).

a: Constante del modelo logístico que indica la posición relativa al origen.

En vista de que la mayoría de las microalgas se reproduce mediante división binaria, la tasa de crecimiento se puede obtener directamente en número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa (Arredondo y Voltolina, 2007), utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu_2 = \frac{[\text{Ln}(\frac{x_2}{x_1}) / \text{Ln}2]}{(t_1 - t_2)}$$

Donde:

$\mu_2$ : Tasa de crecimiento.

$x_2$  y  $x_1$ : Concentración determinada en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ .

El tiempo de duplicación y/o generación ( $t_g$ ), es el tiempo necesario para que se duplique la población. Cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado como:

$$t_g = \text{Ln } 2 / \mu_e = 0.693 / \mu_e$$

Cuando se experimenta con cultivos de microalgas, es importante conocer la curva de crecimiento en las condiciones en las cuales se está trabajando, ya que este dato podrá ser utilizado para establecer los tiempos en los cuales es necesario cosechar la biomasa, lo cual permite comparar organismos en las fases de crecimiento conocidas (Arredondo y Voltolina, 2007).

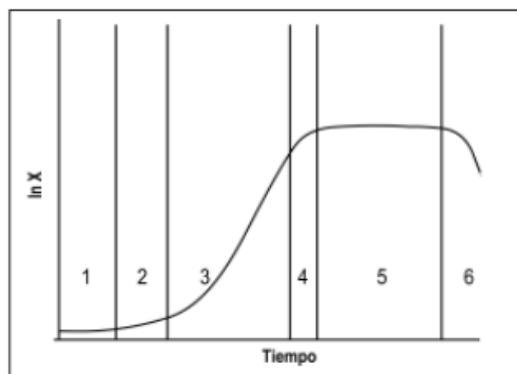
Según el estudio realizado por Aslan y Kapdan (2006), las tasas iniciales de absorción de sustratos, R, se utilizan para determinar los coeficientes. El sustrato inicial de absorción es calculado de la siguiente manera:

$$\%R = \left( \frac{C_0 - C}{C_0} \right) \times 100$$

Donde R representa la tasa de absorción del sustrato,  $C_0$  es la concentración inicial del sustrato (nitrato, nitritos, amonio y fosfatos), C es la concentración final del sustrato.

### 2.7.1. Fases de crecimiento

En el cultivo de microalgas del tipo discontinuo (batch), donde hay crecimiento celular por un tiempo limitado, se pueden diferenciar las siguientes fases:



**Figura 3. Fases de crecimiento de un cultivo de microalgas. (1) Fase lag, (2) Fase de aceleramiento, (3) Fase exponencial, (4) Fase de desaceleración, (5) Fase estacionaria y (6) Fase de muerte.**

Fuente: Tomado de Arredondo y Voltolina, 2007.

- Fase lag: También conocida como fase de adaptación, es la primera de las fases que puede observarse en el crecimiento de las microalgas (ver Fig. 3). Esta fase representa un retardo en el crecimiento del número de células, debido al proceso de adaptación de las condiciones fisiológicas y metabólicas de la microalga para aprovechar las nuevas condiciones de cultivo en las que se encuentran (cantidad de luz, temperatura, nutrientes, agitación, etc.) (Arredondo y Voltolina, 2007).

La duración de esta fase depende mucho de dos factores la adaptación de la microalga al medio y la densidad del inóculo. Diferentes investigaciones han demostrado que, si la microalga inoculada ha sido adaptada al medio de cultivo, ya no se registra una fase de crecimiento lag (Martínez *et al.*, 2000; Andersen, 2005). Otro factor influyente es la densidad del inóculo inicial, siendo que a mayor densidad de inóculo menor es el tiempo de adaptación (Yang *et al.*, 2014).

- Fase de aceleramiento: En esta fase, las microalgas ya se encuentran adaptadas al medio y los diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el ARN, seguido de las proteínas y del peso individual (Arredondo y Voltolina, 2007).

- Fase exponencial: Durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente. En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, algunas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3.5 horas (Brennan y Owende, 2010).

- Fase de desaceleración: Se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de cultivo son su-óptimas. En consecuencia, la tasa de duplicación disminuye, aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor (Andersen, 2005).

- Fase estacionaria: 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 puede ser ocasionado por la baja concentración de algún nutriente esencial, alto valor del pH (por consiguiente, poca disponibilidad de sustrato fotosintético CO<sub>2</sub>), o también por la baja penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de autosombreado) (Arredondo y Voltolina, 2007).

- Fase de muerte: La tasa de mortalidad es superior a la 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 (Arredondo y Voltolina, 2007).

## **2.8. La microalga: *Chlorella* sp.**

El género *Chlorella* pertenece al Phylum *Chlorophyta*, Clase *Trebouxiophyceae*, Orden *Chlorellales*, Familia *Chlorellaceae* (Guiry, 2020). Descrita por primera vez por Martinus Beijerinck en 1890; Las células de *Chlorella* son esféricas o elipsoidales con un diámetro que varía de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 4). Están distribuidas en diversos hábitats como en agua dulce, agua de mar, etc. (Richmond y Hu, 2013).

En la actualidad esta microalga viene siendo muy estudiada gracias a las características que presenta como: alta tasa de crecimiento, competitividad y tolerancia a una gran variedad de condiciones ambientales (Caffagni *et al.*, 2015), capacidad para absorber y asimilar rápidamente el dióxido de carbono y los nutrientes (nitrógeno y fósforo) de las “aguas residuales” (Richmond y Hu, 2013), productos de interés químico-farmacéutico (Gómez, 2007), alta producción de lípidos, ácidos grasos y biocombustibles (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Tejada-Benítez *et al.*, 2015; Cobos *et al.*, 2016) y su uso como biofertilizantes (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

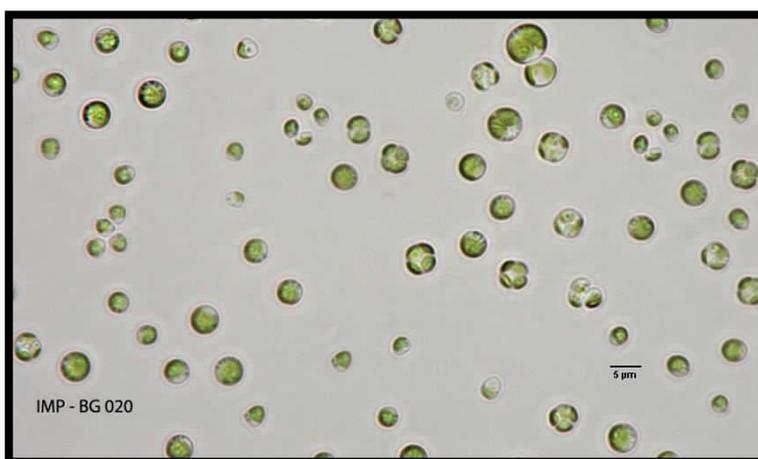
Las especies del género poseen marcadas diferencias en cuanto al comportamiento ante factores como la salinidad, acidez y elevadas temperaturas, aunque de forma general, toleran amplios intervalos de salinidad y de pH (Rodríguez *et al.*, 2014). La mayoría de las especies del género crecen con gran facilidad, lo que favorece el desarrollo de sus cultivos; debido a esto frecuentemente se utilizan como modelo biológico en investigaciones fisiológicas y bioquímicas (Van den Hoek *et al.*, 1995). Esta microalga es una de las especies más abundantes y frecuentes en la flora de las aguas residuales y lagunas de oxidación (Lincoln y Earle, 1990); crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37 °C en condiciones de cultivo a cielo abierto.

El dióxido de carbono es la principal fuente de carbono para la fotosíntesis de *Chlorella*. La microalga utiliza el dióxido de carbono principalmente en su forma no disociada ( $\text{CO}_2$  o  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). La atmosfera contiene solo 0.039 % de  $\text{CO}_2$  lo cual no es suficiente para sostener un rápido crecimiento y debido a eso la aireación en los cultivos de *Chlorella* es acompañada

con un flujo de CO<sub>2</sub> que varía entre 1 – 5 %. El posible incremento de CO<sub>2</sub> puede inhibir el crecimiento o causar daño celular en los cultivos debido al bajo pH por una alta concentración de CO<sub>2</sub> (Richmond y Hu, 2013).

En un estudio realizado por Shi *et al.* (2000) se demostró que la *Chlorella* puede utilizar diferentes formas de nitrógeno que pueden ser nitratos, amonio, urea y glicina. Algunas especies de *Chlorella* deficientes en las enzimas nitrato/nitrito reductasas pueden usar el amonio para su crecimiento. El fósforo es uno de los elementos abundantes más requeridos para el crecimiento normal de la *Chlorella*, utilizan normalmente este elemento bajo la forma de fosfatos, así como también bajo la forma de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>1-</sup> o HP<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Otros nutrientes inorgánicos importantes para el crecimiento de esta microalga son S, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, etc. a pesar de necesitar estos nutrientes en pequeñas cantidades, son muy necesarios para una sobrevivencia prolongada de la microalga (Richmond y Hu, 2013).

Numerosos estudios han demostrado que la microalga *Chlorella* puede remover eficientemente nutrientes (N y P) y contaminantes orgánicos de varias fuentes de aguas residuales, especialmente cuando se trata previamente mediante sedimentación, proceso de lodo activado, o simplemente dilución con agua o medio de cultivo (Mallick y Rai, 1994; Tam *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Imagen de la microalga *Chlorella* sp. (cepa IMP-BG 020).

**Fuente:** Tomada de IMARPE (<http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/servicios/banco-germoplasma>).

En la tabla 2 se presenta la clasificación taxonómica e información de la especie *Chlorella* sp., según los datos de IMARPE:

**Tabla 2: Clasificación taxonómica de la especie *Chlorella* sp. utilizada en la investigación**

<b>Código</b>	<b>IMP-BG-020</b>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>Chlorella</i> sp.
Origen	Cajamarca – Período 2011
Colector y Fecha	Jimmy Oblitas, 2011
Obtención de Cepa y Fecha	Cecil Tenorio, 2011
Temp. de crecimiento	18 °C
Medio de Cultivo	CHU #10
Intensidad lumínica	19 – 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

FUENTE: Banco de germoplasma, IMARPE.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El estudio se realizó en el Laboratorio del Invernadero y Sala de Procesos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) (Figura 5), ubicado entre la esquina Gamarra y General S/N Chucuito, distrito de La Punta, provincia de Callao y departamento de Lima (Coordenadas 12.0669° S, 77.1578° W); con el apoyo de las áreas del Laboratorio de Sala de Microalgas y el Laboratorio de Análisis Instrumental de la misma institución desde octubre del 2017 a enero del 2018.



**Figura 5. Instalaciones del Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).**

#### **3.2. Tipo y diseño de la investigación**

De acuerdo con el análisis, el presente estudio corresponde a una investigación cuantitativa con diseño experimental aleatorio simple. Teniendo en cuenta esto, se diseñaron tres unidades experimentales; un blanco (B), un control (C) y un tratamiento (T), todas con tres

réplicas cada una; donde B fue considerado el patrón de medida para nitratos, nitritos, amonio y fosfatos en el agua de precocción del manto de pota; C, representó el efecto del medio suplementado con Bayfolan (nutriente foliar líquido que además de aportar macronutrientes -N, P y K- y vitaminas, es de bajo costo), sobre la microalga y; T, representó el efecto del agua de precocción del manto de pota más el cultivo de la microalga en una concentración 50% v/v. Todas las unidades experimentales se acondicionaron siguiendo procedimientos que guardaran la esterilidad de los medios, tanto para el caso del medio del agua de precocción de pota que procedía de un tratamiento térmico llevado a casi 90 °C y el cultivo de la microalga que provenía del Laboratorio de Sala de Microalgas en donde las cepas se manejan en condiciones estériles.

Durante el experimento los medios fueron provistos de aireación controlada solo en el día durante toda la duración de la investigación, esta aireación fue suministrada de la combinación de aire más CO<sub>2</sub> (flujo de 0.5 L/min) esto para mantener un pH neutro.

Para el análisis de las variables, se compararon el grupo blanco (B) con el grupo tratamiento (T) para analizar el porcentaje y tasa de remoción de los nutrientes, mientras que el grupo control (C) y el grupo tratamiento (T) fueron comparados para evaluar el crecimiento celular mediante ensayos de densidad celular y biomasa seca.

### **3.3. Variables**

En el estudio se analizaron cuatro variables (tabla 3) consideradas como fundamentales para la solución de la hipótesis:

- La variable independiente es el medio de cultivo (medio Bayfolan y medio con agua de precocción de pota).
- Variables dependientes son la biomasa, la densidad celular y absorción de nutrientes.

### 3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 3: Características de las variables que se analizaron en el medio de precocción del manto de pota

Variable					
Tipo	Nombre	Definición	Naturaleza	Indicador	Autor
INDEPENDIENTE	Nutrientes presentes en el agua de precocción de la pota	Nitratos, nitritos, amonio y fosfatos (Sin el nutriente Bayfolan en el cultivo)	Cualitativa	_____	_____
DEPENDIENTE	Biomasa seca	Cantidad de material microalgal acumulada	Cuantitativa	$DW (g/mL) = [m2 (g) - m1 (g)] / 2 mL$	Richmond y Hu, 2013
	Densidad celular	Crecimiento microalgal		Determinación por microscopia	Arredondo y Voltolina, 2007
	Porcentaje promedio de absorción de nutrientes	Promedio de la cantidad de nutrientes absorbidos (nitratos, nitritos, amonio y fosfatos), durante el experimento, en relación a la concentración inicial.		Determinación por absorbancia	_____
				$\%R = \left( \frac{C_0 - C}{C_0} \right) \times 100$	Aslan y Kapdan, 2006

### **3.5. Metodología**

Para el estudio se seleccionó la especie IMP-BG-020 *Chlorella* sp., la cual fue donada por el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos y proporcionada como inóculo, en fase exponencial, por el Laboratorio de Sala de Microalgas del IMARPE, fueron 4 botellas con 7 L de cultivo de *Chlorella* entregadas por parte del laboratorio y en cada botella la densidad aproximada de cultivo fue de  $5.6 \pm 0.89 \times 10^6$  cel/mL; mientras que las muestras de agua de precocción del manto de pota fueron caracterizadas bajo los procedimientos industriales utilizados por empresas de congelado de pota.

#### **3.5.1. Determinación de la mejor concentración de agua de precocción de pota para el cultivo de la microalga *Chlorella* sp.**

##### **a. Caracterización del agua de precocción del manto de pota**

La metodología usada para la cocción del manto de pota fue realizada según procedimientos industriales utilizados en diversas empresas de congelado en la ciudad de Paita, Piura (Monterroso, 2011). El manto de pota utilizado fue obtenido en el terminal pesquero de Ventanilla, para luego ser trasladado manteniendo la cadena de frío hacia el Laboratorio del Invernadero y Sala de Procesos del IMARPE. En este recinto se procedió con el lavado y retiro de la piel, para luego ser cortado en filetes pequeños y posteriormente cocinados (anexo 4).

Para este estudio, se utilizaron 14 kg de manto de pota fresca fileteados, que fueron divididos en 4 lotes (3.5 kg cada lote), y cocinados en aproximadamente 7 L de agua a 90 °C por 15 min/lote. Se obtuvieron 27 L de agua de precocción del manto, se dejaron en reposo y oscuridad por un intervalo de 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el análisis respectivo de los nutrientes iniciales presentes en el efluente obtenido por triplicado (Tabla 4) empleando el fotómetro multiparámetro (Hanna modelo HI8320), mediante técnica colorimétrica de reducción por cadmio para el caso de nitrógeno como nitratos, adaptación del método de sulfato ferroso para el caso de nitrógeno como nitritos, adaptación del método de Nessler, D1 426-92, de ASTM Manual of Water and Environmental Technology, para el caso de nitrógeno como amonio y adaptación del método aminoácido de Standard Methods for the

Examination of Water and Wastewater (*18<sup>o</sup> edición*), para el caso de fósforo como fosfatos, se consideró realizar diluciones para el análisis debido a los altos valores obtenidos.

**Tabla 4: Valores promedio de los nutrientes iniciales en el agua de precocción de pota en la mezcla final de los cuatro lotes**

Parámetro	Bajo la forma de	Valor (mg/L)
<b>Nitratos</b>	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>80.3 ± 2.42</b>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N	18.1 ± 1.78
<b>Nitritos</b>	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>59 ± 2.21</b>
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	18 ± 2.52
	NaNO <sub>2</sub>	88 ± 3.54
<b>Fosfatos</b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>357 ± 3.47<sup>(a)</sup></b>
	P	117 ± 2.65 <sup>(a)</sup>
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	267 ± 3.61 <sup>(a)</sup>
<b>Amonio</b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>180 ± 4.04<sup>(b)</sup></b>
	NH <sub>3</sub> - N	139 ± 4.74 <sup>(b)</sup>
	NH <sub>3</sub>	169 ± 2.83 <sup>(b)</sup>

\*Los valores representan los promedios ± desviación estándar de las variables.

(a) Dilución llevada a 10<sup>-1</sup>

(b) Dilución llevada a 10<sup>-2</sup>

#### **b. Determinación de la concentración adecuada del agua de precocción del manto de pota**

Como primer paso, se determinó la concentración adecuada del agua de precocción del manto de pota (APCP) con el cultivo microalgal (CM), con el objetivo de fijar la mezcla adecuada donde la microalga pueda desarrollarse y no perder su potencialidad como organismo biorremediador. Se realizaron los ensayos en envases de 7 L, con las siguientes diluciones:

- 1:1 (Cultivo Microalgal / Agua de precocción del manto de pota)
- 3:7 (Cultivo Microalgal / Agua de precocción del manto de pota)

Para obtener la cantidad apropiada de agua de precocción del manto de pota, así como la del inóculo para el presente estudio, se realizó un procedimiento de *screening* y se evaluó el

crecimiento en la microalga *Chlorella* sp., utilizándose dos proporciones de volumen del inóculo / agua de precocción del manto de pota, estas fueron: 1:1 y 3:7, realizándose dos repeticiones para cada una de las proporciones propuestas (anexo 3).

Se registraron parámetros abióticos como temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH por 10 días utilizando un multiparámetro portátil WTW Multi 350i/SET; así como también se realizaron conteos utilizando la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina (2007) y como materiales la cámara de Neubauer para el conteo de la densidad celular y un microscopio óptico, también se realizaron mediciones de concentración de nitratos de forma diaria, utilizando técnicas colorimétricas mediante el uso de un fotómetro multiparámetro.

Con la proporción determinada y la microalga *Chlorella* sp., en el Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos del IMARPE, se acondicionaron cultivos discontinuos totalmente al azar donde se identificaron al blanco, grupo que solo contenía agua de precocción y se empleó para comparar los valores obtenidos de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos con el tratamiento; a su vez se identificó al control el cual contenía a la microalga *Chlorella* sp. en condiciones de cultivo normales y que se empleó para comparar la densidad y biomasa seca con el tratamiento, Todos los grupos fueron preparados por triplicado en envases de plástico de 7 L de acuerdo con las mezclas descritas en la tabla 5, aireación constante mezclado con CO<sub>2</sub> (flujo de 0.5 L/min) solo en el día, fotoperiodo 12:12 y por un periodo de 8 días.

**Tabla 5: Resumen de las unidades experimentales en condiciones de invernadero para el desarrollo de la investigación**

<b>Grupo</b>	<b>Unidad experimental</b>	<b>N° de réplicas</b>
<b>Blanco (B)</b>	Agua de precocción de pota (100%), sin inóculo	3
<b>Control (C)</b>	Inóculo (densidad $2.8 \pm 0.89 \times 10^6$ cel/mL) + agua enriquecida con nutriente foliar líquido Bayfolan* (0.28 mL/L) (1:1)	3
<b>Tratamiento (T)</b>	Inóculo (densidad $2.8 \pm 0.89 \times 10^6$ cel/mL) + agua de precocción de pota (1:1)	3

\*Composición química del Bayfolan en anexo 2

### 3.5.2. Determinación de la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de la microalga *Chlorella* sp., en términos de biomasa y densidad celular en el agua de precocción del manto de pota.

Diariamente se tomaron muestras de 50 mL de c/u de los envases tanto en el *screening* como en el experimento final, con el fin de medir la densidad celular (cel/mL) por dos métodos; uno de ellos por recuento celular, empleando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Leica model DM1000 LED), con el objetivo de 40X y el segundo método fue por densidad óptica. Dicha medición fue realizada a una longitud de onda de 686 nm en un espectrofotómetro (VARIAN Cary 50 BIO UV-Visible) (Cervantes, 2015). Las cuantificaciones fueron realizadas diariamente y por triplicado.

El número de células se estimó mediante las siguientes ecuaciones (Arredondo y Voltolina, 2007):

$$C = N \times 10^4 \times \text{dil}$$

En donde:

C se da en células/mL

N es el promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL),

Dil es el factor de dilución (cuando se consideró diluir la muestra)

10<sup>4</sup> es el factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL.

Debido al tamaño de la microalga y según lo explicado por Arredondo y Voltolina (2007), las células se contaron en el cuadro central (25 cuadros), la concentración celular se calculó de acuerdo con la siguiente formula:

$$C = [(N / 4) / 10^{-6}] \times \text{dil}$$

En donde:

C se da en células/mL,

N es el promedio de células presentes en los 5 cuadros pequeños del cuadro central, 4 x 10<sup>-6</sup> corresponde al volumen de la muestra expresada en cm<sup>3</sup> (mL) sobre el área de los cuadros pequeños la cual equivalen a 0.004 mm<sup>3</sup> (0.004 µL) (0.2 x 0.2 x 0.1)

Dil es el factor de dilución (de haberse diluido).

Paralelamente a la evaluación del crecimiento de la microalga, se realizó un seguimiento de la producción microalgal, mediante la biomasa seca (g/mL), se determinó el peso seco de la muestra (DW), siguiendo el protocolo de Zhu y Lee (1997).

Para la determinación de la masa seca, la muestra de 5 mL se filtró en un sistema de filtración al vacío (35 – 55 mm Hg) y luego se enjuagó el filtro con 1 mL de aguas desionizada; previamente para evitar la difusión del líquido, los bordes de los filtros (m1) (Filtro Whatman GF/G 25 mm) fueron humedecidos. Luego de la operación de la operación de filtrado, los filtros fueron colocados en placas petri y llevados a secar a una estufa (MMM modelo VUK/VU 55) a 95 °C durante 4hrs. Finalmente, fueron retirados y colocados en un desecador por 30 min, transcurrido el tiempo, fueron pesados (m2) en una microbalanza (Sartorius modelo MSA3.6P-000-DM).

El peso seco (DW) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$DW \text{ (g/mL)} = [m2 \text{ (g)} - m1 \text{ (g)}] / 10 \text{ mL}$$

Donde:

m1: Es el peso del filtro seco solo.

m2: Es el peso del filtro más la muestra seca.

Se determinó a su vez la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), durante la fase de crecimiento exponencial tanto para el control como para el tratamiento, utilizando la ecuación 1. Para lo cual, se determinó el inicio y final de la fase de crecimiento exponencial mediante el ajuste de la curva de crecimiento a una curva exponencial; determinando de esta manera que el final de la etapa exponencial se alcanzaba cuando el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) era mayor a 0.90 y se alcanzaba como mínimo la duplicación celular. También se determinó el tiempo de duplicación (TD) utilizando la ecuación 2.

$$\mu = \frac{\ln C2 - \ln C1}{\Delta T} \text{ (Ecuación 1)}$$

$$TD = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde:

C1: Concentración inicial de microalgas en la fase exponencial (cel/mL)

C2: Concentración final de microalgas en la fase exponencial (cel/mL)

$\Delta T$ : Variación del tiempo desde el inicio hasta el final de la fase de crecimiento exponencial.

Uno de los objetivos principales en temas de tasa de crecimiento de cultivos en microalgas es demostrar que un determinado tratamiento (el agua de precocción de manto de pota y *Chlorella* sp.) rendirá mayor concentración que el procedimiento que hace uso de un medio ya conocido (el uso del fertilizante foliar Bayfolan y *Chlorella* sp.), lo cual implica seleccionar el momento más adecuado para la cosecha. Es así que para esto es necesario determinar con seguridad el inicio y final de cada fase de crecimiento, para realizarlo se procedieron con las sumas progresivas de las tasas de crecimiento diario ( $\Sigma\mu$ ), ya que cualquier cambio de la pendiente de esta nueva curva de dispersión indica una variación de la velocidad de duplicación (Arredondo y Voltolina, 2007).

La densidad celular máxima (DCM) fue determinada como el máximo valor registrado durante los conteos realizados diariamente con la cámara Neubauer.

Además, diariamente se tomaron datos de pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxígeno disuelto (mg/mL) y salinidad (ppm) de los cultivos con un multiparámetro (WTW modelo 2F40-114B0E).

### **3.5.3. Determinación del factor de relación N/P del agua de precocción del manto de pota.**

El primer paso para el tratamiento de aguas es conocer su composición y de este modo emplear la técnica más apropiada, debido a ello se determinó la relación N/P propuesta por Redfield en 1958.

Diversos autores han concluido que la relación N/P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que cuanto más próxima esté a la composición de los microorganismos, mayor crecimiento y toma de nutrientes tendrá lugar (Ruiz, 2011). Por

ejemplo, para la microalga *Chlorella* la relación óptima es de 8:1 según Aslan y Kapdan (2008). Sin embargo, las microalgas son capaces de adaptarse al medio de cultivo y tomar uno de los nutrientes en una proporción mayor que la presente, en principio, en su composición celular (Ruiz, 2011).

De esta forma, la relación N/P es un valor que permite conocer el estado nutricional de la microalga, valores mayores a 20 indican una deficiencia en fósforo mientras que valores cercanos a 10, deficiencia en nitrógeno (González, 2010).

En la tabla 6 se describe el procedimiento utilizado para el cálculo de la relación N/P, la cual nos sirvió para determinar si el agua de pota es el ideal para el desarrollo de la microalga o se encuentra limitado por algún nutriente.

**Tabla 6: Procedimiento para el cálculo de la relación N/P en el agua de precocción del manto de pota**

Número de moles de N en:	Número de moles de P en:
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>
- 1 mol N = 14 g.	- 1 mol P = 31 g.
- 1 mol O = 16 g.	- 1 mol O = 16 g.
- 1 mol de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 1N + 3O	- 1 mol de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> = 1P + 4O
- <u>Proporción de N en NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>	- <u>Proporción de P en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></u>
$N/(N + 3O) = 14/(14+3 \times 16) = 0.226$	$P/(P + 4O) = 31/(31+4 \times 16) = 0.326$
$\Rightarrow (\text{NO}_3^- \text{ mg/L})(0.226 \text{ mg/mL N})$	$\Rightarrow (\text{PO}_4^{3-} \text{ mg/L})(0.326 \text{ mg/mL P})$
$\Rightarrow$ “a” mg/L N	$\Rightarrow$ “d” mg/L P
- 1 mmol N = 14 mg $\Rightarrow$ “a”/14 = “x” mmol N	1 mmol P = 31 mg $\Rightarrow$ “d”/14 = “w” mmol P
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	
- 1 mol N = 14 g.	
- 1 mol O = 16 g.	
- 1 mol de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> = 1N + 2O	
- <u>Proporción de N en NO<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	
$N/(N + 2O) = 14/(14+2 \times 16) = 0.3$	
$\Rightarrow (\text{NO}_2^- \text{ mg/L})(0.3 \text{ mg/mL N})$	
$\Rightarrow$ “b” mg/L N	
- 1 mmol N = 14 mg $\Rightarrow$ “b”/14 = “y” mmol N	
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	
- 1 mol N = 14 g.	
- 1 mol H = 1 g.	
- 1 mol de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 1N + 4H	
- <u>Proporción de N en NH<sub>4</sub><sup>+</sup></u>	
$N/(N + 3H) = 14/(14+3 \times 1) = 0.8$	
$\Rightarrow (\text{NH}_4^+ \text{ mg/L})(0.8 \text{ mg/mL N})$	
$\Rightarrow$ “c” mg/L N	
- 1 mmol N = 14 mg $\Rightarrow$ “c”/14 = “z” mmol N	

Entonces:

- Nitrógeno total = “x + y + z”
- Fósforo total = “w”

$$\Rightarrow \text{N/P} = (\text{x} + \text{y} + \text{z}) / \text{w}$$

### **3.5.4. Determinación de la concentración diaria y porcentaje promedio final de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos del agua de precocción del manto de pota por la microalga *Chlorella* sp.**

Diariamente, se tomaron 40 mL de cada unidad experimental por triplicado, en las cuales se midieron las concentraciones de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos, mediante técnica colorimétrica de reducción por cadmio para el caso de nitrógeno como nitratos, adaptación del método de sulfato ferroso para el caso de nitrógeno como nitritos, adaptación del método de Nessler, D1 426-92, de ASTM Manual of Water and Environmental Technology, para el caso de nitrógeno como amonio y adaptación del método aminoácido de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (18<sup>o</sup> edición), para el caso de fósforo como fosfatos.

Para efectos de este análisis se tomaron 40 mL de muestra de agua del tratamiento, blanco y control por triplicado en tubos Falcon con capacidad de 50 mL. Luego, fueron centrifugados (centrifuga EPPENDORF 5702 R). Seguidamente, se realizaron diluciones para las lecturas de los parámetros anteriormente mencionados.

Con los valores obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de concentración final de estos nutrientes según la fórmula ubicada en (Aslan y Kapdan, 2006):

$$\%R = \left( \frac{C_0 - C}{C_0} \right) \times 100$$

Donde:

- %R: Porcentaje de remoción del nutriente
- C<sub>0</sub>: Concentración inicial del nutriente en agua residual
- C: Concentración final del nutriente luego del tratamiento

Se determinaron los valores diarios de nutrientes para observar el comportamiento de la microalga en el medio de cultivo.

### **3.5.5. Análisis estadístico**

La descripción de los datos se efectuó en Excel (versión 2013), utilizando los datos promedio y la desviación estándar. Con la finalidad de estandarizar las ecuaciones de crecimiento, se correlacionaron los promedios de la densidad celular (cel/mL) y peso seco (g/L) con la densidad óptica (nm) calculándose los índices de correlación de Pearson (r) mediante una regresión lineal. En cuanto a los valores de nitrógeno y fósforo obtenidos en el agua de pota, se relacionaron los promedios de las concentraciones de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos con respecto al tiempo de cultivo a fin de obtener la tendencia de reducción de estos.

Así mismo, a través del programa estadístico, Minitab 18, se evaluó la normalidad para las variables para cada tratamiento mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de confianza del 95 % y la homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Según las características de los datos, se utilizaron pruebas paramétricas (ANOVA) y posteriormente la comparación de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Si no se cumplía los supuestos de normalidad los datos fueron analizados mediante la prueba no-paramétrica (Kolmogorov-Smirnov), considerando un nivel de significancia  $p < 0.05$  para todos los ensayos y se determinó si existió o no diferencia entre el tratamiento y el control o el blanco.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. *Screening* de la concentración de agua de precocción de pota para el cultivo de la microalga *Chlorella* sp.

En la tabla 7 se resumen los valores obtenidos de las densidades celulares (cel/mL) de la microalga cultivada y las concentraciones de nitratos (mg/L) en el agua de pota caracterizadas en las concentraciones 1:1 y 3:7 (Inóculo de microalga:H<sub>2</sub>O de pota). De acuerdo con la figura 6, la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. mostró mayores valores de densidad celular en el medio de cultivo con la proporción 1:1 en comparación con el medio de proporción 3:7.

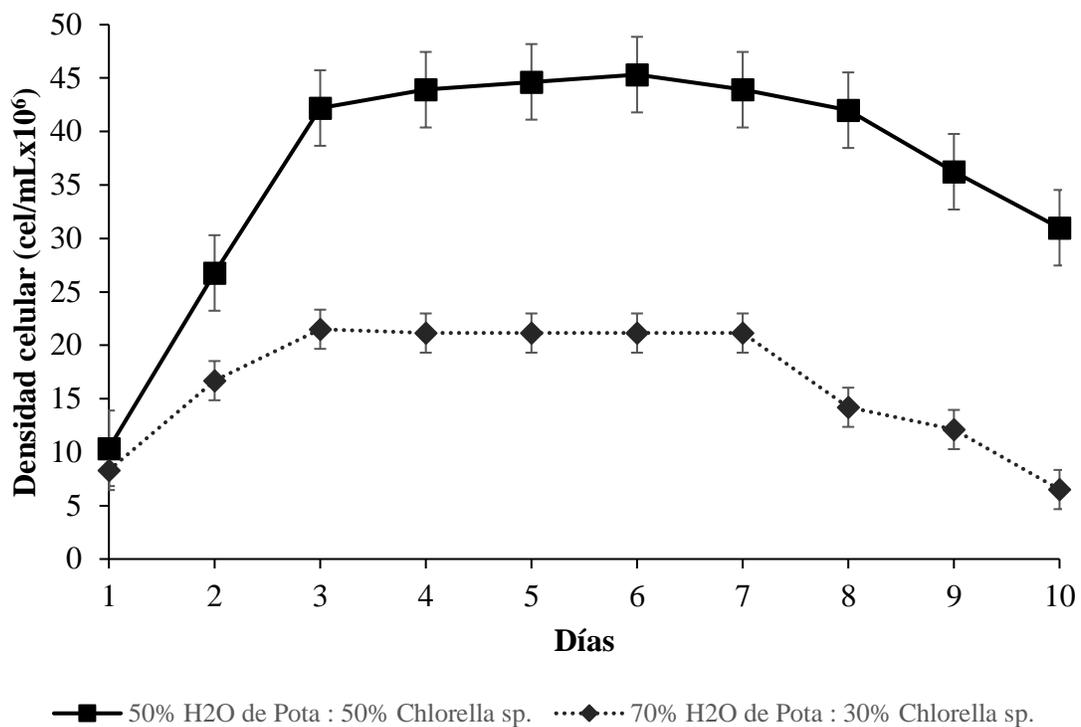
Mientras que en la figura 7 observamos como las concentraciones de nitratos han ido disminuyendo a través de los días, tal vez respondiendo al incremento celular de las microalgas (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Se puede observar también que el contenido de nitratos en el agua de precocción de pota es alto al inicio, pero debido a las vías metabólicas de las microalgas este nitrato es transformando hasta poder ser asimilado por la microalga (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Para ambos casos hubo una reducción en la concentración de nitratos; sin embargo, la microalga que mejor relación tuvo respecto a la densidad celular y la remoción de nitratos fue la *Chlorella* sp. en la proporción 1:1.

Reforzando lo anterior y de acuerdo con las Figuras 6 y 7, en donde se observaron un mayor crecimiento celular y reducción de nitratos por parte de la microalga *Chlorella* sp. en la concentración 1:1 del agua de pota, que se evidenció en una mayor densidad celular obtenida

( $31 \times 10^6$  cel/mL) y una reducción de la concentración de los nitratos de hasta un 94% (de 910 a 53.5 mg/L) al finalizar el *screening*. Por tales motivos se continuó la experimentación con la mencionada microalga y concentración.

**Tabla 7: Valores de concentración de nitratos y densidad celular en el *screening* de la microalga *Chlorella* sp. en el agua de pota**

Días	1:1 ( <i>Chlorella</i> sp.:H <sub>2</sub> O de Pota)		3:7 ( <i>Chlorella</i> sp.: H <sub>2</sub> O de Pota)	
	Concentración de Nitratos (mg/L)	Densidad Celular (cel/mL)	Concentración de Nitratos (mg/L)	Densidad Celular (cel/mL)
1	910	10,361,111	910	8,288,889
2	557	26,768,597	426	16,691,225
3	225	42,200,000	149	21,500,000
4	190	43,914,600	170	21,143,794
5	175	44,649,429	192	21,143,794
6	161	45,327,732	223	21,143,794
7	147	43,915,967	173	21,143,794
8	128	42,000,000	86	14,200,000
9	89	36,241,611	94	12,118,919
10	53.5	31,000,000	115.6	6,500,000



**Figura 6.** Densidades celulares de la microalga *Chlorella* sp., en el agua de precocción del manto de pota bajo diferentes concentraciones (1:1 y 3:7), cultivo de *Chlorella* sp. y agua de precocción del manto de pota, respectivamente) en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).

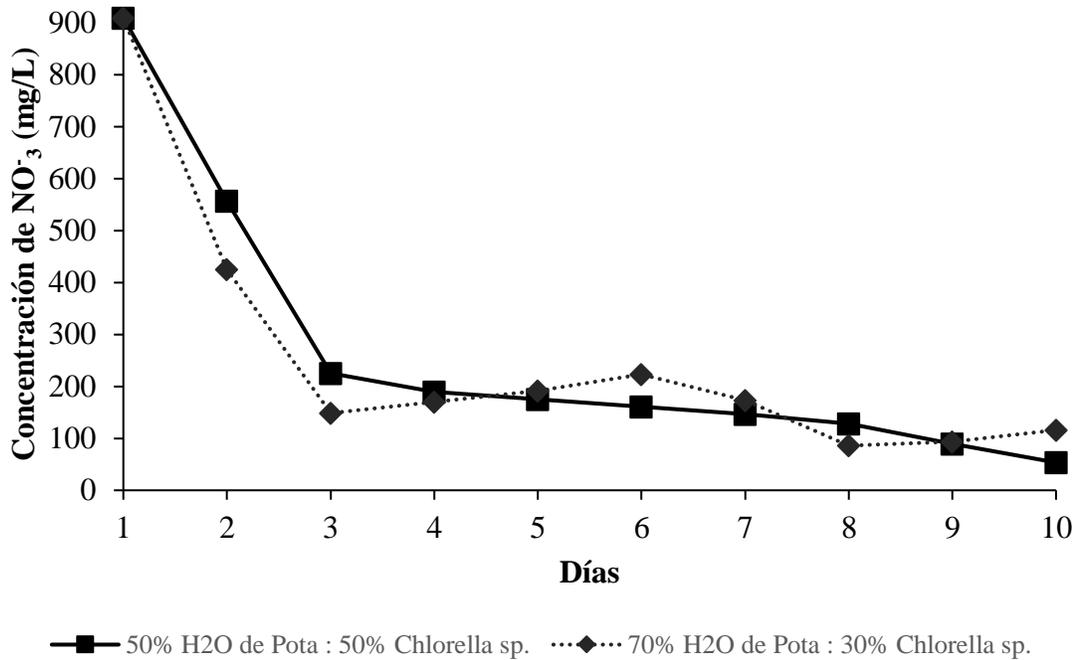


Figura 7. Concentración diaria de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en los cultivos de *Chlorella* sp., bajo diferentes concentraciones en condiciones de invernadero.

#### 4.2. Determinación de la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de la microalga *Chlorella* sp. en términos de biomasa y densidad celular en el agua de precocción del manto de pota

##### a. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación

En las tablas 8 y 9 se presentan los cálculos y estimaciones de los parámetros de cultivo de *Chlorella* sp., para dos medios diferentes, medio enriquecido con Bayfolan y el medio de agua de precocción del manto de pota (1:1). Los valores reportados indican un mejor crecimiento celular en el medio cultivado con Bayfolan comparado con el medio que utiliza el agua de pota (1:1), este resultado se ve evidenciado en la tasa de crecimiento acumulada la cuál fue constante desde el día 3 con valores cercanos a 3.5, mientras que en el medio con agua de pota los valores obtenidos fueron cercanos a 3 y al igual que en el medio con Bayfolan se mantuvo constante desde el tercer día hasta el final de la experimentación; otro de los factores analizados fue el tiempo de duplicación de la microalga en el medio de cultivo que se mostró variable para ambos medios de cultivo pero con mejores valores reportados en el medio con agua de pota, sin embargo no llego a alcanzar la concentración celular reportada en el medio Bayfolan. Esto puede

ser explicado en las figuras 8 y 9 donde se puede observar que el periodo de adaptación por parte de la microalga al medio de cultivo con agua de pota fue más prolongado que el observado en el medio con Bayfolan.

**Tabla 8: Recuento celular, Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento ( $\mu_2$ , calculada a partir de  $\log_2$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu_2$ ) y tiempo duplicación (TD) de un cultivo de *Chlorella* sp., cultivada en medio enriquecido con Bayfolan (control)**

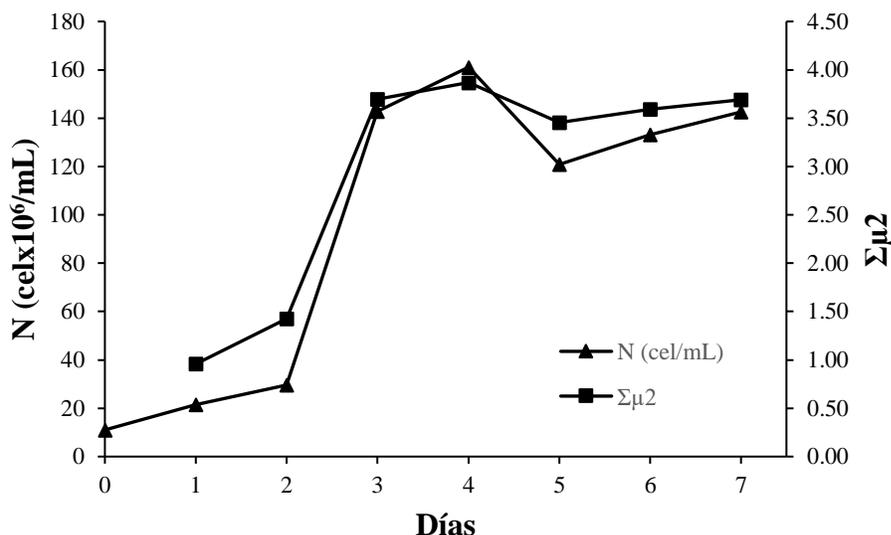
Tiempo (días)	N (cel/mL)	Ln N	$\mu_2$	$\Sigma\mu_2$	TD
0	11,027,777.78	16.216	--		
1	21,416,666.67	16.880	0.9576	0.9576	1.0443
2	29,638,888.89	17.205	0.4688	1.4263	2.1333
3	142,805,555.56	18.777	2.2685	3.6948	0.4408
4	161,111,111.11	18.898	0.1740	3.8688	5.7470
5	120,833,333.33	18.610	-0.4150	3.4538	-2.4094
6	133,055,555.56	18.706	0.1390	3.5928	7.1937
7	142,500,000.00	18.775	0.0989	3.6917	10.1078

**Tabla 9: Recuento celular, Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento ( $\mu_2$ , calculada a partir de  $\log_2$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu_2$ ) y tiempo duplicación (TD) de un cultivo de *Chlorella* sp., cultivada en medio de agua de precocción del manto de pota (1:1)**

Tiempo (días)	N (cel/mL)	Ln N	$\mu_2$	$\Sigma\mu_2$	TD
0	10,361,111.11	16.154	--		
1	21,472,222.22	16.882	1.0513	1.0513	0.9512
2	36,000,000.00	17.399	0.7455	1.7968	1.3413
3	59,027,777.78	17.894	0.7134	2.5102	1.4017
4	81,055,555.56	18.211	0.4575	2.9677	2.1857
5	77,805,555.56	18.170	-0.0590	2.9087	-16.9383
6	81,277,777.78	18.213	0.0630	2.9717	15.8761
7	82,944,444.44	18.234	0.0293	3.0010	34.1479

En la figura 8 se presentan las gráficas de la concentración celular y de la suma progresiva de las tasas de crecimiento ( $\Sigma\mu_2$ ) en el medio de cultivo de *Chlorella* sp., enriquecido con Bayfolan con respecto al tiempo. La curva de dispersión de suma progresiva de tasa de crecimiento indica

que el crecimiento exponencial terminó a partir del día 3, después del cual la pendiente de la  $\Sigma\mu_2$  disminuyó, como consecuencia de la menor velocidad de división celular (fase de desaceleración), mientras que la falta de aumento del valor de la  $\Sigma\mu_2$  en los días siguientes indica que en esos días la *Chlorella* sp., ya se encontraba en la fase estacionaria.



**Figura 8.** Crecimiento del cultivo *Chlorella* sp., en medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (▲) y como suma progresiva de tasas de crecimiento (■).

En la figura 9 se presentan las gráficas de dispersión contra el tiempo de la concentración celular y de la suma progresiva de las tasas de crecimiento ( $\Sigma\mu_2$ ) en el medio de cultivo de

*Chlorella* sp., y el agua de precocción del manto de pota. La curva de dispersión de suma progresiva de tasa de crecimiento nos indica que el crecimiento exponencial poco pronunciado terminó a partir del día 4, después del cual la pendiente de la  $\Sigma\mu_2$  disminuyó ligeramente, como consecuencia de la menor velocidad de división celular (fase de desaceleración), mientras que la falta de aumento del valor de la  $\Sigma\mu_2$  en los días siguientes indica que en esos días la *Chlorella* sp., ya se encontraba en la fase estacionaria.

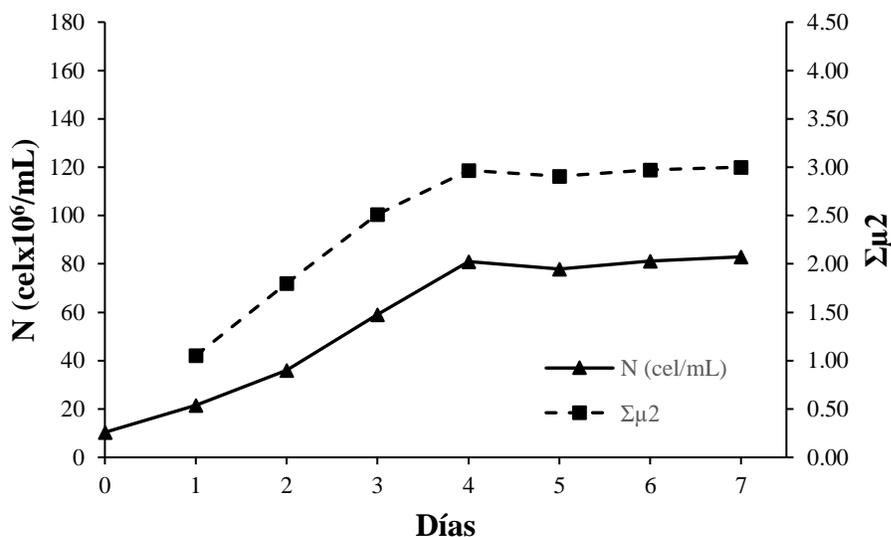


Figura 9. Crecimiento del cultivo *Chlorella* sp., en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL (▲) y como suma progresiva de duplicaciones celulares (■).

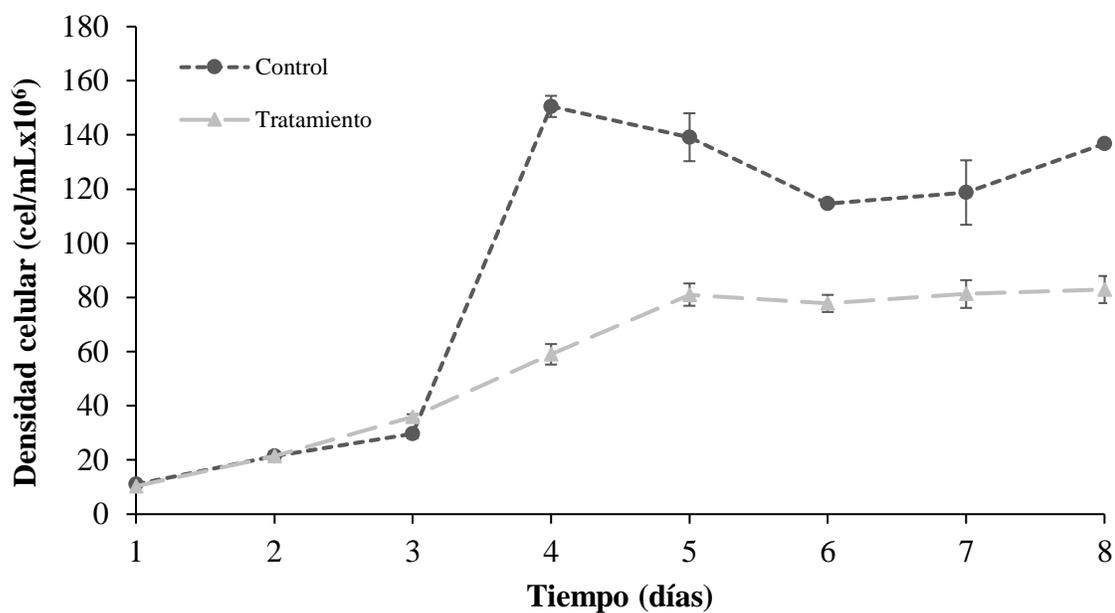
#### b. Productividad de la microalga *Chlorella* sp.

Al graficar los datos de densidad celular y biomasa seca de los grupos experimentales, se evidenció el crecimiento con una tendencia exponencial (Fig. 10 y Fig. 11), según lo reportado en estudios sobre crecimiento en microalgas (Andersen, 2005; Arredondo y Voltolina, 2007).

En la figura 10 se puede observar que la curva de crecimiento del tratamiento tuvo una disminución en la pendiente hasta llegar al día 5. Lo que estaría indicando el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estabilidad (Andersen, 2005). Mientras que la curva de crecimiento de la *Chlorella* sp., cultivada en medio Bayfolan (control), tuvo un comportamiento similar pero la disminución en la pendiente se dio hasta llegar el día 4. Esta diferencia de los días puede explicarse en el período de latencia que la microalga tiene para adaptarse a determinado medio en el que es cultivada (Arredondo y Voltolina, 2007).

Al realizar la evaluación entre los ensayos (ANOVA), con respecto a la densidad celular, se mostraron diferencias significativas entre el grupo control y tratamiento ( $p = 0.022$ ); también se observaron estadísticamente diferencias significativas en el medio control entre los días, donde se pudo observar el incremento de las densidades celulares con respecto al valor inicial para el cultivo de *Chlorella* sp., en Bayfolan de hasta  $150.54 \pm 6.77$  cel/mL  $\times 10^6$ , al cuarto día del

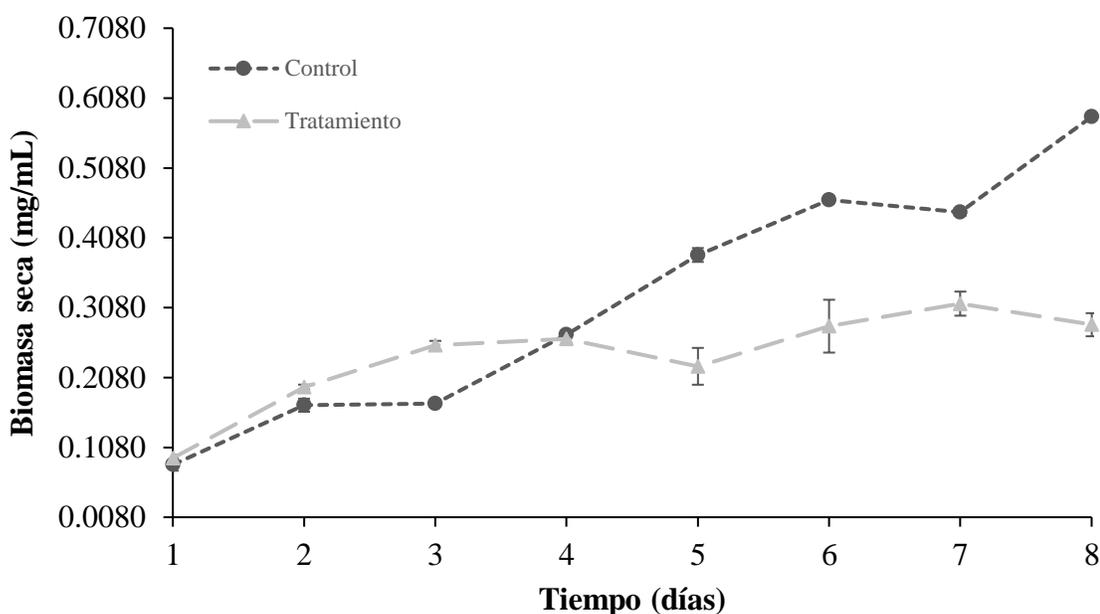
experimento. Mientras que para el cultivo de *Chlorella* sp., en agua de precocción del manto de pota se observaron diferencias significativas en el día 4 con respecto a los demás días registrándose una densidad celular de  $59.03 \pm 6.55$  cel/mL  $\times 10^6$ ; sin embargo, la mayor densidad celular registrada se dio al quinto día del experimento con un valor de  $81.07 \pm 7.12$  cel/mL  $\times 10^6$ . El valor máximo de densidad celular de *Chlorella* sp. registrado en el tratamiento fue el 53% del registrado en el medio control (*Chlorella* sp. y Bayfolan), esto hace indicar que la utilización del agua de precocción del manto de pota como medio de cultivo fue buena ya que se observó un crecimiento exponencial de la microalga y la curva de crecimiento tuvo un comportamiento típico de la curva teórica de las fases de crecimiento de las microalgas.



**Figura 10.** Comparación de las densidades celulares de la microalga *Chlorella* sp. en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL ( $\blacktriangle$ ) y en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL ( $\bullet$ ) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).

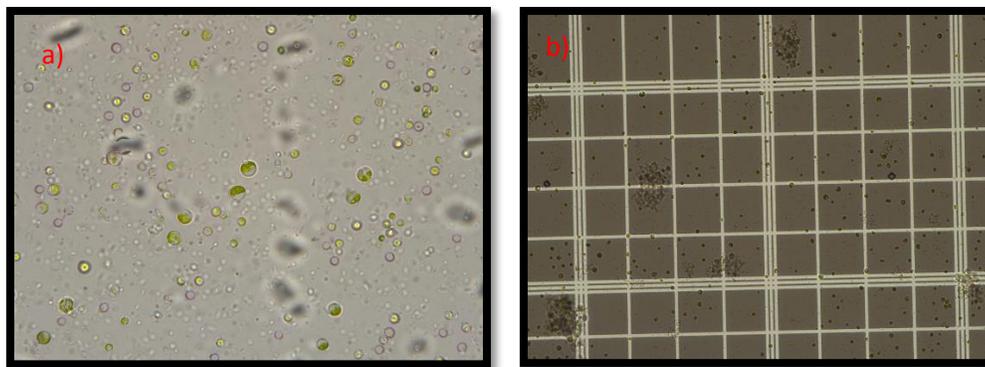
En tanto en la figura 11 se puede observar que la curva de biomasa seca del control se mantuvo con una pendiente positiva durante gran parte del experimento, mientras que la curva de biomasa seca del tratamiento se mantuvo constante a partir del tercer día hasta finalizar el estudio.

Por el lado de la biomasa seca, se mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p = 0.034$ ); mientras que en el medio control (*Chlorella* sp. y Bayfolan) estadísticamente existen diferencias significativas entre los días donde se pudo observar el incremento con respecto al valor inicial de hasta  $0.58 \pm 0.0019$  mg/mL, al octavo día del experimento. Por el lado del tratamiento también se observaron diferencias significativas en el día 7 donde se obtuvo un valor de  $0.31 \pm 0.0173$  mg/mL. El valor máximo de biomasa seca de *Chlorella* sp., registrado en el medio de agua de precocción del manto de pota fue el 53% del registrado en el medio control, mismo valor reportado en la densidad celular.



**Figura 11. Comparación de la biomasa seca de la microalga *Chlorella* sp. en el agua de precocción del manto de pota en cel/mL (▲) y en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).**

Además, durante la etapa de crecimiento, la morfología de las células cultivadas en el agua de precocción de pota no se vio afectada; con respecto a las células del grupo control (Fig. 12)



**Figura 12. Morfología de las células en el día 8 de tratamiento (40x). a) Cultivo de *Chlorella* sp., en el agua de precocción de pota; b) Cultivo de *Chlorella* sp., en el medio enriquecido con Bayfolan puesta en la cámara de conteo.**

La curva de crecimiento microalgal representa el desarrollo del número de células viables presentes en un cultivo a lo largo del tiempo de estudio, es por eso que la cuantificación de forma precisa y efectiva es importante para la mayoría de estudios de fisiología y biotecnología algal (Griffiths *et al.*, 2011), para su realización, existen numerosas metodologías que pueden ser trabajosas y complicadas de automatizar, por ejemplo el conteo celular por microscopía, peso seco o por determinación de biomoléculas. Es por esta razón que el presente estudio investigó como optimizar el monitoreo del crecimiento de la cepa *Chlorella* sp., obteniendo ecuaciones predictivas del crecimiento microalgal mediante la relación entre la densidad celular, biomasa seca y absorbancia del cultivo ( $DO_{686}$ ). Otros estudios con cepas dulceacuícolas y empleando diferentes longitudes de onda, 680 nm (*Scenedesmus quadricauda*, *S. obliquus*, *S. dimorphus*, *Scenedesmus* sp., *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella* sp.) y 600 nm (*Chlorella vulgaris*), también encontraron buenas correlaciones utilizando la densidad óptica,  $r^2=98-99\%$  y  $99\%$  (Huo *et al.*, 2015).

Con los resultados obtenidos de densidad óptica ( $DO_{686}$ ), densidad celular y biomasa seca, se realizó un análisis de regresión lineal, donde finalmente se observó una correlación directa significativa entre la densidad óptica y el crecimiento de la microalga, tanto al ser evaluado como densidad celular y como biomasa seca (figura 19 y 20). Las ecuaciones lineales determinadas y que son mostradas en el anexo 1 y se podrán emplear para estimar la densidad celular y productividad de la microalga *Chlorella* sp para posteriores trabajos.

### 4.3. Determinación del factor de relación N/P del agua de precocción del manto de pota

Con las concentraciones iniciales (Tabla 3) de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en mg/L presentes en el agua de precocción del manto de pota y las ecuaciones propuestas en la metodología (Tabla 6), se determinó la relación N/P en el agua de pota (Tabla 10):

**Tabla 10: Concentraciones iniciales de nitrógeno y fósforo calculadas, expresadas en mmol y relación N/P en el agua de precocción del manto de pota**

Medio	$\text{NO}_3^-$ (mmol N)	$\text{NO}_2^-$ (mmol N)	$\text{NH}_4^+$ (mmol N)	$\Sigma$ N (mmol)	$\text{PO}_4^{3-}$ (mmol P)	N/P
Agua de pota	1.29	1.26	1,028.57	1,031.12	83.13	12.40

En estudios realizados sobre los efectos de la relación de N/P en la productividad de la microalga y remoción de nutrientes en aguas residuales municipales, se consideró que el valor óptimo del ratio N/P varía entre 5 y 30, dependiendo de las condiciones que tenga determinada agua (Choi y Lee, 2014). La relación de N/P calculada en el agua de precocción del manto de pota fue de 12.40, valor que está dentro del rango según los valores reportados por Choi y Lee (2014).

A continuación, se muestra la relación de N/P (Fig. 13) que se registró para cada día hasta el final del experimento para cada unidad experimental. Según los resultados obtenidos a lo largo del experimento el ratio de N/P en el blanco se mantuvo constante con valores entre 1 y 2, mientras que tanto para el control y tratamiento el ratio de N/P se comportó de forma diferente incrementándose a través de los días llegando a valores máximos entre 9 y 8, respectivamente. Estos valores se ajustan a los reportados por Choi y Lee, 2014 (ratio de N/P entre 5 y 30). Estos resultados también indicaron que la producción de biomasa es altamente dependiente de los ratios de N/P en el medio.

El factor de relación de N/P en el agua de precocción del manto de pota tuvo un valor máximo de 8, este número se encuentra dentro de los valores reportados en bibliografía que señalan que el valor óptimo del ratio N/P para una buena productividad y reducción de nutrientes para tratamiento de aguas residuales municipales varía entre 5 y 30, dependiendo de las condiciones de esta.

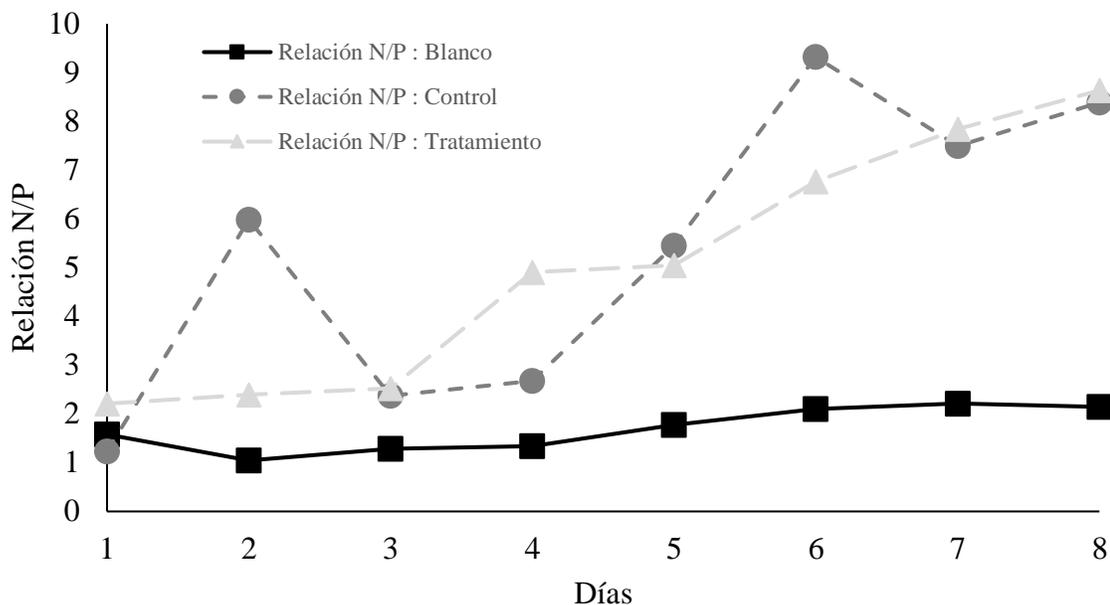
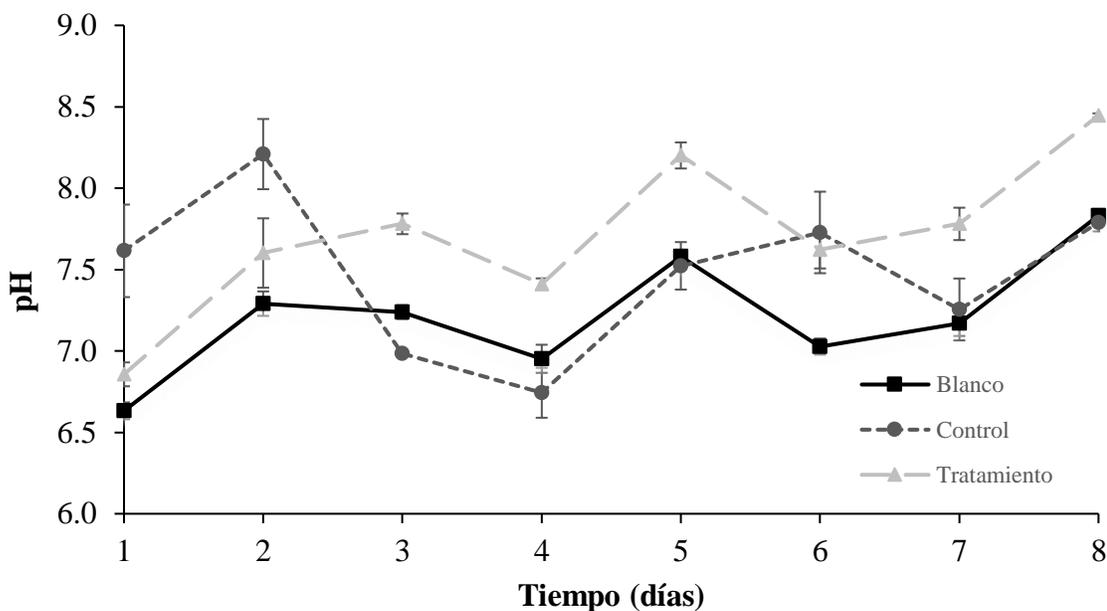


Figura 13. Comparación de las relaciones N/P en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲).

#### 4.4. Análisis de la variación de pH y parámetros abióticos, determinación de la concentración diaria, porcentaje promedio final de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos del agua de precocción del manto de pota por la microalga *Chlorella* sp.

El pH es un parámetro específico de cada especie de microalga, con una influencia significativa en su metabolismo y que está relacionado con el crecimiento celular. En este estudio se registraron diferencias significativas entre todas las unidades experimentales ( $p=0.002$ ); se registró un pH de  $7.21 \pm 0.36$  en promedio de los días para el blanco (agua de precocción de manto de pota) llegando a un valor máximo de 7.83 en el día 8 esta variación en los días puede explicarse debido al sistema de aireación usado ya que si bien al inicio los medios se encontraban estériles es muy probable que se hayan podido desarrollar microorganismos que al estar al contacto con la materia orgánica presente en el agua hayan hecho oscilar el pH, según González (1996) el pH generalmente refleja la descomposición de la materia proteica y la emisión de amoníaco, comportándose como un indicador importante de la contaminación de las aguas; que determinan la acidez o alcalinidad del medio; por otro lado para el control se registró un pH  $7.48 \pm 0.47$  en promedio y llegando a un valor máximo de 8.21 en el día 2 y para el tratamiento

se registró un pH de  $7.71 \pm 0.48$  en promedio y llegando a un valor máximo de 8.45 en el día 8 (Fig. 14). Respecto al pH se sabe que un aumento en este parámetro puede estar relacionado a la acumulación de  $\text{OH}^-$ , lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017). También se conoce que la neutralidad es una característica de la mayoría de las especies de microalga, sin embargo, en el medio de cultivo de aguas residuales se produce un aumento gradual del pH debido al efecto sobre el equilibrio de especies carbonatadas en el agua, esto se explica durante la asimilación de  $\text{CO}_2$  en la fase luminosa de la fotosíntesis (García-Gozalbes *et al.*, 2015). Este comportamiento fue similar al de otro estudio en el que las microalgas aprovecharon el agua residual; en este trabajo se reportó un ligero aumento durante los primeros 5 días, de aproximadamente 6.86 a 8.2, lo que también justifica que podría deberse a la captación de  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis de algas (Su *et al.*, 2012).



**Figura 14. Comparación de los valores de pH en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).**

En la tabla 11 se presentan los valores en promedio obtenidos para los parámetros abióticos analizados (pH, oxígeno disuelto, temperatura y salinidad), el pH registrado para todas las unidades experimentales se encuentra dentro del óptimo para el cultivo microalgal, estos valores son similares a los reportados por Khalil *et al.* (2010) donde indica que cierta especie de

*Chlorella* puede crecer en un rango amplio de valores de pH (4-10) y la mayor productividad en biomasa es lograda en ambientes alcalinos (pH = 9 y 10). En cuanto a los valores de temperatura reportados todos se mantuvieron dentro de los 22 °C estando dentro del rango reportado por Lee *et al.* (2017) que indica que la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las microalgas se encuentra entre 20-30 °C. Respecto a los resultados de oxígeno disuelto los valores se encontraron variables para las tres unidades experimentales, siendo constante en el tiempo para el caso del blanco mientras que para el caso del control a partir del día seis se pudo observar un incremento para luego descender, contrario al caso del tratamiento en el cual se pudo observar que tuvo un comportamiento parecido a la curva de la densidad celular, es oportuno señalar que concentraciones altas de oxígeno disuelto pueden inhibir el crecimiento de las microalgas (Kazbar *et al.*, 2019). Finalmente, los valores de salinidad que se obtuvieron fueron menores a 2 ppm, siendo el control quien presentó el valor más bajo en promedio ( $0.31 \pm 0.04$ ), mientras que tanto el blanco y tratamiento presentaron valores por encima de 1 ppm esto podría deberse a las sales (cloruros) presentes en el agua de precocción del manto de pota (Monterroso, 2011).

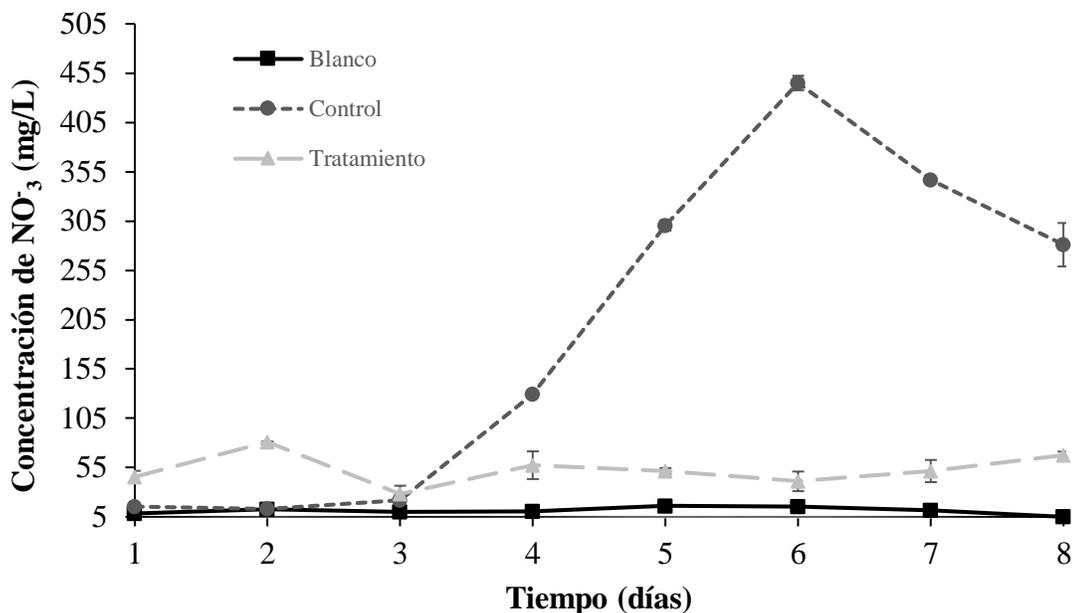
**Tabla 11: Valores obtenidos de los parámetros abióticos: pH, oxígeno disuelto (O.D.), temperatura (T) y salinidad, analizados en cada unidad experimental**

Parámetro	Blanco	Control	Tratamiento
pH	$7.21 \pm 0.36$	$7.48 \pm 0.47$	$7.71 \pm 0.48$
O.D. (mg/L)	$5.71 \pm 0.74$	$6.96 \pm 1.88$	$4.54 \pm 2.18$
T (°C)	$22.43 \pm 2.36$	$22.73 \pm 2.57$	$22.98 \pm 2.70$
Salinidad (ppm)	$1.35 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.04$	$1.03 \pm 0.12$

\*Los valores representan los promedios  $\pm$  desviación estándar de las variables.

En relación a la concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (Fig. 15), se observó que para el blanco (agua de cocción de manto de pota) la tendencia a través de los días fue decreciente llegando a una reducción de nitratos del 41.44 %, esto se debió al efecto de la aireación o el uso de  $\text{CO}_2$ , pues algunos autores sugieren que la aplicación de  $\text{CO}_2$  es una condición más efectiva para incrementar la biomasa microalgal en medios de cultivo ricos en nutrientes (Paes *et al.*, 2016). De otro lado, el tratamiento (agua de cocción de manto de pota y *Chlorella* sp.) tuvo un comportamiento casi constante a través del tiempo con un leve incremento al final de la experimentación (concentración inicial de nitratos  $45.77 \pm 10.30$  mg/L y concentración final de

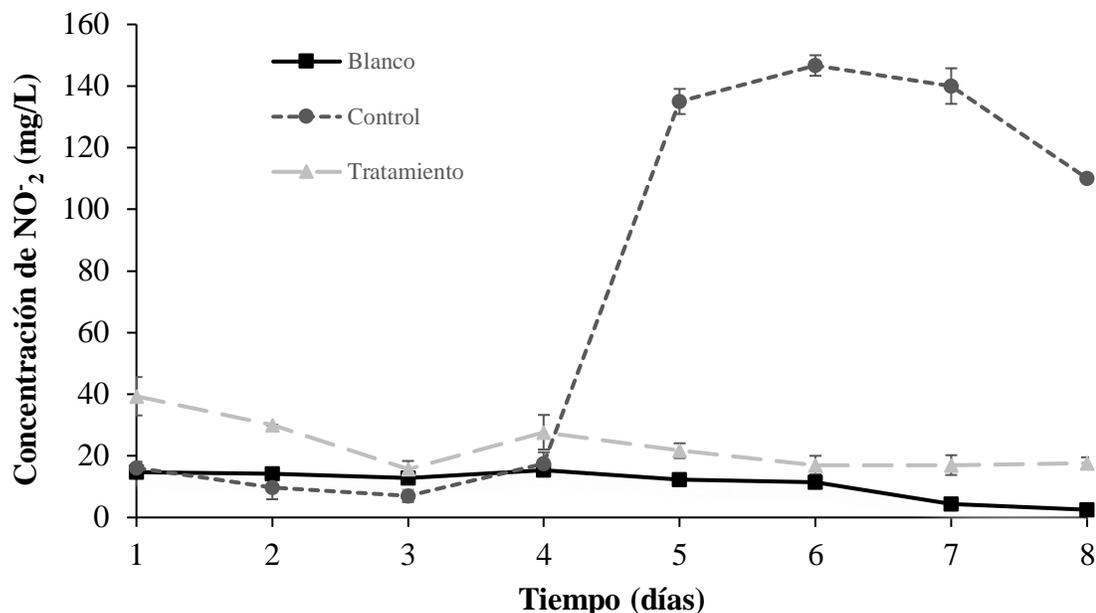
nitratos  $67.37 \pm 6.67$  mg/L). Mientras que en el control (Bayfolan y *Chlorella* sp.) se observó una tendencia creciente de la concentración de nitratos llegando a un máximo de  $445.00 \pm 12.73$  mg/L al día 6. Al efectuarse la prueba de Kruskal-Wallis, se evidenció que los grupos experimentales presentaron diferencias significativas entre los valores de nitratos. El medio control registro los valores más altos de nitratos a partir del día 4 y este valor empezó a incrementarse a través de los días, mientras que en el blanco y el tratamiento los valores de nitratos se mantuvieron constantes hasta el final del experimento. Por otro lado realizando el análisis por cada unidad experimental se observó que en el blanco (B) hubo diferencias significativas en el día 5 (donde se reportó la mayor concentración de nitratos  $16.23 \pm 3.08$  mg/L) con respecto a los demás días, con respecto al control (C) se observaron diferencias significativas en el día 6 con respecto a los demás días registrándose la mayor concentración de nitratos ( $445.00 \pm 12.73$  mg/L) y finalmente en el tratamiento (T) se pudo observar que no existieron diferencias significativas con respecto a los días. La presencia de nitratos y nitritos en el medio blanco y tratamiento se debe a que la pota posee una abundante fracción nitrogenada no proteica, (25-34% del nitrógeno total) que es de gran importancia pues se encarga de impartir el sabor y aroma (bases orgánicas, nucleótidos y aminoácidos libres) a la vez que se utiliza como indicador de calidad (trimetilamina y bases volátiles) (Pariona, 2011). Esta abundante fracción nitrogenada no proteica, según Rosas-Romero *et al.* (2010), se encuentra dentro del 1% de los sólidos totales del efluente de una cocción industrial de pota a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  x 25 minutos, de los cuales el 75% representa proteína cruda. También en el agua de precocción de pota podemos encontrar aminoácidos de los cuales, el 60% lo constituyen aquellos que imparten el sabor en los calamares, como son el ácido glutámico, serina, glicina, argenina, alanina, leucina y lisina. El nitrógeno es representado en dos especies nitrogenadas dentro de la red metabólica de la microalga; nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). El nitrato es convertido en amoniaco endógeno para que pueda ser utilizada por la microalga (Guerra-Rentería *et al.*, 2019). A través de la temperatura empleada en la obtención del agua de precocción del manto de pota se da la desnaturalización de la proteína lo que lleva consigo a formación de compuestos orgánicos (proteínas, aminoácidos, nucleótidos, etc.) e inorgánicos (nitratos, nitritos, amonio, etc.) que son de alguna forma absorbidos por la microalga y que debido a esto y a otros parámetros (temperatura, pH, etc.) se produce el incremento de la densidad celular.



**Figura 15. Promedio de concentración diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).**

En relación con la concentración de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) (Fig. 16), se observó que para el blanco (agua de cocción de manto de pota) y el tratamiento (agua de cocción de manto de pota y *Chlorella* sp.) la tendencia a través de los días fue decreciente llegando a tener una reducción de nitritos de 83.05 % y 55.08 %, respectivamente. Mientras que para el control (Bayfolan y *Chlorella* sp.) se pudo observar un incremento a través de los días llegando a finalizar el experimento con una concentración final de  $110.00 \pm 0.00$  mg/L. Al efectuarse la prueba de Kruskal-Wallis, se evidenció que los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas entre los valores de nitritos. El medio control registro los valores más altos de nitritos a partir del día 4 y este valor empezó a incrementarse a través de los días, mientras que en el blanco y el tratamiento los valores de nitritos llegaron a 16.95 y 44.92 %, respectivamente con respecto a las concentraciones iniciales de nitritos. Por otro lado realizando el análisis por cada unidad experimental se observó que en el blanco (agua de cocción de manto de pota), no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo de experimentación, con respecto al control (Bayfolan y *Chlorella* sp.) se observaron diferencias significativas desde el día 5 al día 8 con respecto a los demás días y finalmente en el tratamiento (agua de cocción de manto de pota y

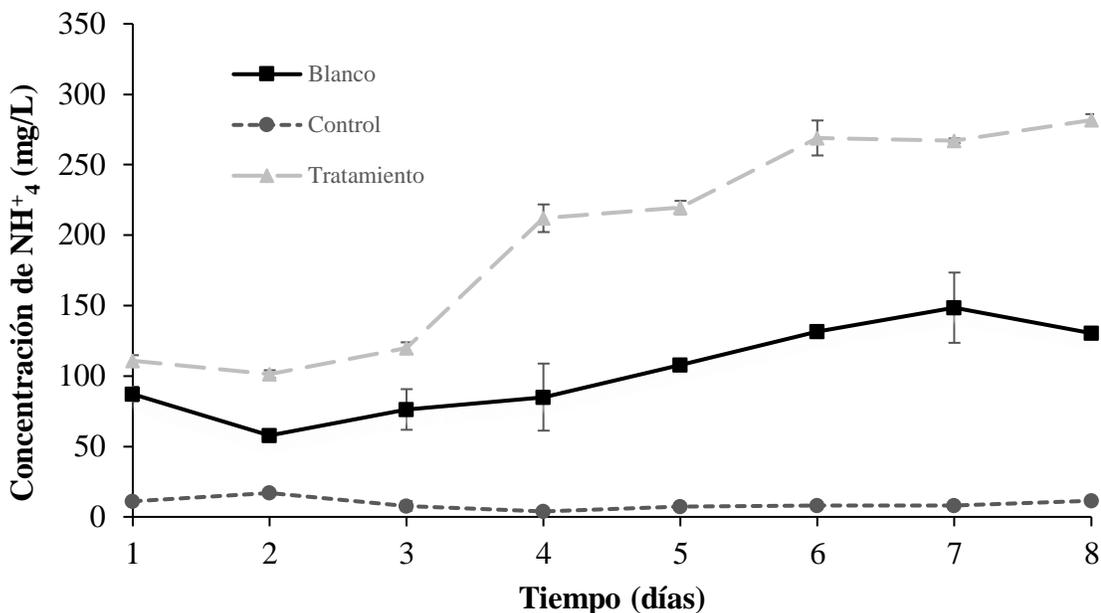
*Chlorella* sp.) se pudo observar que en el día 3 hubo diferencias significativas con respecto a los demás días y se obtuvo la mayor reducción de nitritos (60.17 %).



**Figura 16. Promedio de concentración diaria de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).**

Al efectuarse la prueba de Kruskal-Wallis, se pudo evidenciar que los grupos experimentales presentaron diferencias significativas entre los valores de amonio. El blanco y tratamiento registraron los valores más altos de amonio a partir del día 4 y estos valores empezaron a incrementarse a través de los días. Se sabe que la pota (*Dosidicus gigas*) está relacionada con la presencia de componentes hidrosolubles, constituidos por altas concentraciones de elementos nitrogenados no proteicos, incluyendo principalmente el cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), además de trimetilamina (TMA), péptidos y aminoácidos (Maza *et al.*, 2007); Esto puede explicar el incremento de los valores de amonio tanto en el blanco como en el tratamiento ya que el cloruro de amonio pudo haber reaccionado con otros elementos generando la liberación de amonio en el medio. Lo anterior puede verse explicado por Albretch (s.f.) que menciona que el calamar gigante de manera natural presenta grandes concentraciones de cloruro de amonio y que al entrar en contacto con el agua estos compuestos se disuelven hasta llegar a un equilibrio debido a que por efecto de la alcalinidad o valores superiores a 7.0 de pH (valores de pH reportados en el

presente trabajo oscilaron entre 6 y 8) el cloruro de amonio se disocia en los líquidos. Respecto a los valores de amonio en el control se mantuvieron constantes hasta el fin del experimento. En relación a la concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Fig. 17), se observó que para la unidad experimental control (*Chlorella* sp. y Bayfolan) la tendencia a través de los días fue constante (concentración inicial de amonio  $11.10 \pm 0.00$  mg/L y concentración final de amonio  $11.31 \pm 3.82$  mg/L), mientras que estadísticamente se observaron diferencias significativas en el día 2 con respecto a los demás días y fue donde se observó la mayor concentración de amonio ( $16.93 \pm 0.60$  mg/L). Con respecto a la unidad experimental blanco (agua de cocción de manto de pota) la tendencia a través de los días fue creciente (concentración inicial de amonio  $81.17 \pm 9.09$  mg/L y concentración final de amonio  $130.33 \pm 2.02$  mg/L), mientras que estadísticamente se observó diferencias significativas en el días 2 con respecto a los demás días. En cuanto al tratamiento (*Chlorella* sp. y Agua de cocción de manto de pota) la tendencia fue creciente también pero con mayores valores de concentraciones de amonio (concentración inicial de amonio  $111.00 \pm 6.56$  mg/L y concentración final de amonio  $281.67 \pm 7.37$  mg/L), estadísticamente se observó diferencias significativas en el día 7 con respecto a los demás días llegando a un valor de concentración de amonio de  $267.0 \pm 2.83$  mg/L). Se sabe que el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se presenta como la forma más oxidada, siendo por lo tanto la de mayor predominancia y fuente principal de nitrógeno en los medios. No obstante, se debe considerar que entre todas las formas de nitrógeno inorgánico: amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) las microalgas prefieren utilizar el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fuente de nitrógeno debido a que su asimilación tiene un menor costo energético al no requerir una reacción redox (Beltrán-Rocha *et al.*, 2017). Sin embargo, la asimilación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) produce iones  $\text{H}^+$ , en la cual, 1 mol de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) genera una 1 mol de  $\text{H}^+$ . Donde la alta absorción de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) disminuye el pH del medio ( $< 6.0$ ), condición ácida que inhibe el desarrollo de las microalgas. Por lo tanto, debido a los cambios de pH durante el consumo de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el cultivo de microalgas, se deberá evaluar el requerimiento del ajuste del pH dependiendo de que se utilicen medios nutritivos o agua bajo tratamiento (Martínez *et al.*, 2000).



**Figura 17. Promedio de concentración diaria de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).**

Al efectuarse el test de Kruskal-Wallis, se evidenció que los grupos experimentales presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de fosfatos. El medio blanco y el control registraron valores casi constantes a lo largo del experimento, mientras que en el tratamiento los valores de fosfatos se redujeron hasta en un 43.29 %. Con relación a la concentración de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Fig. 18), se observó que el blanco (agua de cocción de manto de pota) mantuvo una tendencia constante a través del tiempo (concentración inicial de fosfatos  $157.33 \pm 4.19$  mg/L y concentración final de fosfatos  $164.75 \pm 0.35$  mg/L), mientras que de acuerdo al análisis estadístico se observó diferencias significativas entre todas las unidades experimentales ( $p < 0.01$ ) y realizando el análisis por cada unidad experimental se observó que en el blanco (B) no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo de experimentación, con respecto al control (C) se observaron diferencias significativas en el día 2 con respecto a los demás días y finalmente en el tratamiento (T) se pudo observar que en el día 8 hubo diferencias significativas con respecto a los demás días y es el día donde se obtuvo la mayor reducción de fosfatos con respecto a la concentración inicial (56.71 %). Existen estudios de especies de calamares en los cuales se presentan una alta concentración de fosfolípidos y de ácidos grasos poliinsaturados. En estos, los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran asociados a lípidos estructurales, en particular

fosfolípidos (Cruz, 2005). Así como los fosfolípidos, también están los nucleótidos que aportan grupos fosfatos al medio a través de la degradación de moléculas de ATP, ADP y AMP que son lixiviados en gran cantidad desde el músculo hacia el efluente (Márquez-Ríos *et al.*, 2007). Rosas-Romero *et al.* (2010) reportó que las concentraciones de nucleótidos, en un estudio que trato sobre la caracterización parcial de un efluente producido por la cocción del musculo del manto del calamar gigante, siguió el siguiente orden  $Hx > ADP > AMP > ATP > IMP > HxR$ . Por lo tanto, estas referencias mencionadas refuerzan el resultado obtenido en el presente estudio donde la concentración inicial de fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) en el agua de precocción del manto de pota reportada fue de aproximadamente 150 mg/L, valor resultante de la degradación de fosfolípidos, ácidos grasos, nucleótidos, etc., en la operación de precocción.

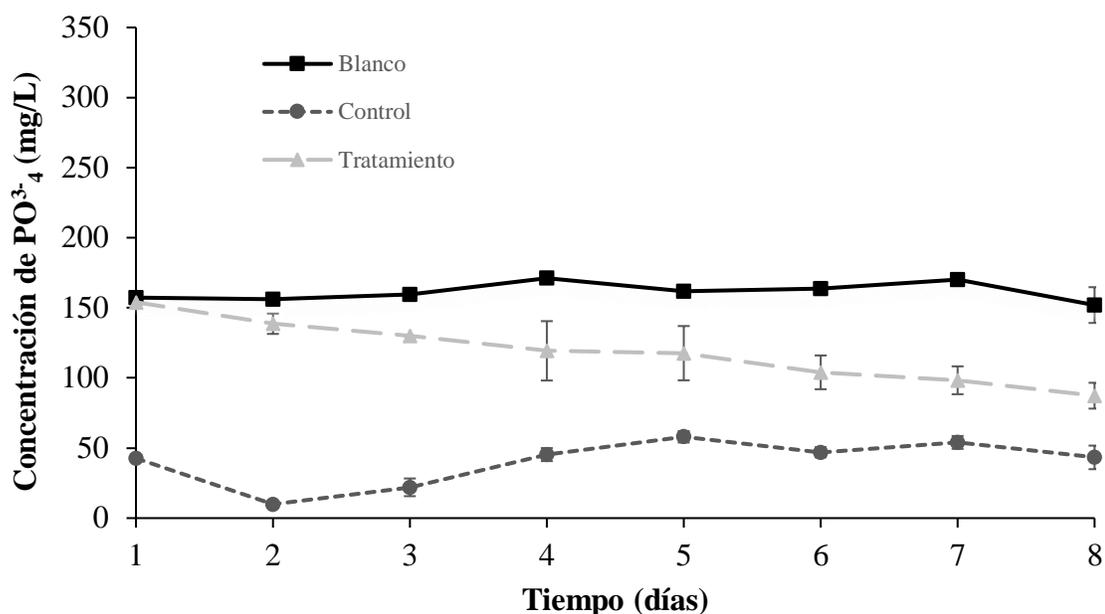


Figura 18. Promedio de concentración diaria de fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) en el agua de precocción del manto de pota sin inóculo (■), en el medio enriquecido con Bayfolan en cel/mL (●) y en el agua de precocción del manto de pota con inóculo (▲) (Barras verticales indican variación del error estándar).

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente experimento se concluye lo siguiente:

1. El agua de precocción generada del manto de pota demostró ser una alternativa viable para el cultivo de la microalga *Chlorella* sp.
2. *Chlorella* sp., mostró un mayor crecimiento celular en el agua de precocción del manto de pota diluida 1:1 con inóculo y en condiciones de invernadero con respecto a la proporción 3:7.
3. Los mejores resultados en la tasa de crecimiento y productividad de *Chlorella* sp. se observaron en el medio enriquecido con Bayfolan con una densidad celular y biomasa máxima de  $150.54 \pm 6.77$  cel/mL  $\times 10^6$  y  $0.58 \pm 0.0019$  mg/mL, respectivamente. A pesar de eso la microalga demostró adaptación y crecimiento cuando fue cultivada en el agua de precocción del manto de pota obteniéndose una densidad y biomasa máxima de  $81.07 \pm 7.12$  cel/mL  $\times 10^6$  y  $0.31 \pm 0.0173$  mg/mL, respectivamente.
4. Las concentraciones diarias de los nutrientes se redujeron en el agua de precocción del manto de pota, a excepción de la concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La concentración final de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el agua de precocción de pota se redujo; sin embargo, se mantuvo una mayor concentración final de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) con respecto al medio enriquecido con Bayfolan.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Investigar y desarrollar otras metodologías que consideren otras variables en el proceso de cultivo y la realización del experimento a mayor escala.

Realizar un proceso previo al uso del agua de precocción de pota, que consistiría en el uso de filtros que reduzcan los sólidos insolubles en el efluente ya que estos son una dificultad si se desea analizar la composición proximal de la microalga al finalizar el tratamiento. Este procedimiento permitiría obtener otro subproducto importante que vendría a ser los sólidos insolubles y que se podrían utilizar en el sector alimenticio. A su vez, se recomienda el monitoreo de contaminantes como protozoarios u otros organismos que podrían afectar el crecimiento de la microalga al ser estos predadores y/o competidores.

Se recomienda la replicación del experimento adicionando suplementos vitamínicos al agua de precocción del manto de pota, permitiendo así un mejor desarrollo de la microalga en este medio. De otro lado, se sugiere realizar una evaluación constante del pH que permita un mayor control en el proceso de cultivo que se ve afectado por la concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) presente en el agua de pota y evaluar la adición de algún tipo de solución amortiguadora (alcalina o ácida) para controlar las variaciones de pH que puedan interferir en el crecimiento de la microalga cultivada.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A.A. & Ibraheem, I.B.M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 257-275. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005
- Albalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E.; Herrero, C. (1995). Sistemas de cultivo y recogida. En Albalde, J., *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones* (p. 80-81). doi: 10.17979/spudc.9788497497695
- Albretch M. (s.f.) Preguntas frecuentes sobre la calidad de la pota (*Dosidicus gigas*). Recuperado de: [www.oannes.org.pe/upload/20160922154605350949975.pdf](http://www.oannes.org.pe/upload/20160922154605350949975.pdf).
- Andersen, R. A. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. En Andersen R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (p. 272 - 275). Recuperado de <https://www.elsevier.com/books/algal-culturing-techniques/andersen/978-0-12-088426-1>
- Andrade, C.E. (2008). Tratamiento terciario de aguas residuales mediante el uso de la microalga *Scenedesmus* sp. en cultivo discontinuo (Tesis de maestría, Universidad de Zulia, Venezuela).
- Arai, K. & Saito, T. (1961). Change in adenine nucleotides in the muscle of some marine invertebrates. *Biochemistry* 192: 451-452. doi: 10.1038/192451a0
- Arredondo, B. & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Editado por Arredondo, B. & Voltolina, D., *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (p. 21-29). La Paz, México. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

- Arroyo, B. (2016). Utilización de residuos sólidos y líquidos de un sistema biofloc como medio de cultivo para la producción de *Scenedesmus* sp. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2775>
- Aslan, S. & Kapdan, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28: 64-70. doi: 10.1016/j.ecoleng.2006.04.003
- Beltrán, J. (2014). Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nuevo León, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México). Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/4340/>
- Beltrán-Rocha, J.; Guajardo-Barbosa, C.; Barceló-Quintal, I.; López-Chuken, U. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52: 417-427. doi: 10.4067/S0718-19572017000300001
- Beuckels, A.; Smolders, E.; Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* 77: 98-106. doi: 10.1016/j.watres.2015.03.018
- Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Boyle, J.W.; Lindsay, R.C.; Struiber, D.A. (1991). Adenine nucleotide degradation in modified atmosphere Chill-stored fresh fish. *Journal of food Science*, 56: 1267-1270. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb04749.x
- Boyle, P. & Rodhouse P. (2005). Fishery Resources. En Boyle P. (Ed.), *Cephalopods: Ecology and Fisheries* (286-287). Recuperado de: <https://www.wiley.com/en-us/Cephalopods%3A+Ecology+and+Fisheries-p-9781405145435>

- Caffagni, E.; Casali, C.; Lombardi, A.; Salgueiro M. (2015). Coupling microalgal cultures with hydroponics: prospection for clean biotechnology processes. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6: 88-94. Recuperdo de: [https://paper10vol6no1%20\(3\).pdf](https://paper10vol6no1%20(3).pdf)
- Camargo, J. & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849. doi: 10.1016/j.envint.2006.05.002
- Cervantes, M. (2015). Determinación del tiempo óptimo de cosecha de la microalga marina *Nannochloropsis oceanica* para la obtención de biocombustible (Tesis de bachiller, Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú).
- Choi, J.H.; Kim, K.T.; Kim, S.M. (2014). Optimization and biochemical characteristics of an enzymatic squid hydrolysate for manufacture of a squid complex seasoning. *Food Science Biotechnology* 23: 417-423. doi: 10.1007/s10068-014-0057-9
- Choi, H.J. & Lee, S.M. (2014). Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38: 761-766. doi: 10.1007/s00449-014-1317-z
- Cobos, M.; Paredes, J.; Castro, J.C. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colombiana*, 21, 17-26. doi: 10.15446/abc.v21n1.47439
- Cruz M., 2005. Relación de perfil de ácidos grasos del cachalote (*Physeter macrocephalus*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el golfo de california (Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México). Recuperado de: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/14348>
- Csirke, J.; Argüelles, J.; Alegre, A.; Ayón, P.; Bouchon, M.; Castillo, G.;... Yamashiro, C. (2018). Biología, estructura poblacional y pesquería de pota o calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Perú, 33: 302-364. Recuperado de: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/3239>

- De la Noüe, J. & De Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, 6: 725-770. doi: 10.1016/0734-9750(88)91921-0
- De la Noüe, J.; Laiberté, G.; Proulx, D. (1992). Algae and wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 4: 247-254. doi: doi.org/10.1007/BF02161210
- Endo K., Fujita M., and Shimizu W., 1989. In: Utilization of Squid. Sugiyama M., Kousu S., Hanabe M., Okuda Y., A.A. Balkema, Rotterdam, Netherland, 77p.
- FAO, documento técnico de pesca 471 (2006). Funcionamiento del criadero: Cultivo de algas. Editado por Lovatelli, A., Cultivo de bivalvos en criadero (p. 45-48). Recuperado de: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Moluscos%20bivalvos/Manual%20de%20bivalvos...pdf>
- García-Gozalbes, C.; Arbib, Z.; Perales-Vargas J.A. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6: 49-68. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-24222015000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000100003)
- Geddes, M.C. (1984). Limnology of lake Alexandrina River, Muarry, South Australia and the effect of nutrients and light on the phytoplankton. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, 35: 399-416. doi: 10.1071/MF9840399
- Gómez, L. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19: 3-20. Recuperdo de: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>
- González, J. (1996). Wastewater characterization. Editado por González, J. Wastewater treatment in the fishery industry. Roma, Italia: FAO. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/V9922E/V9922E00.htm>
- González, L. (2010). Influencia de la diferencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* (Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Colombia). Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/11055207.pdf>

- Griffiths, M.; Garcin, C.; van Hille, R.; Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119-123. doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.005
- Guerra-Renteria, A.; García, A.; Gómez, C.; Gómez, A.; González, Y.; González, O. (2019). Metabolic Pathway Analysis of Nitrogen and Phosphorus Uptake by the Consortium between *C. vulgaris* and *P. aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 1-9. doi: 10.3390/ijms20081978
- Guiry, M.D. 2020. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado de: [https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=43426&sk=0](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43426&sk=0)
- Hatagoshi, Y. (1989). Chemical properties. Editado por Sugiyama, M., Utilization of squid (p. 86-87). Tokyo, Japón. A.A. Balkema.
- Hernández-Pérez, A. & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49: 157-173. doi: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Huo, S.; Zhou, W.; Wang, Z.; Zhu, S.; Dong, L.; Huang, W.; Yuan, Z.; Dong, R. (2015). Biomass Measurement of Microalgae Cultivated under Photoautotrophic Conditions for Biofuels. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 37: 1447-1454. doi: 10.1080/15567036.2012.742597
- Instituto del Mar del Perú, 2019. Informe: Desarrollo de la pesquería del calamar gigante en el mar peruano durante el 2019. Recuperado de: [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/desarrollo\\_pesqueria\\_calamar\\_gigante\\_2019.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/desarrollo_pesqueria_calamar_gigante_2019.pdf)
- Kassemarn, B.; Sanz, B.; Murray, J.; Jones, N. (1963). Nucleotide degradation in the muscle of iced haddock (*Gadus aeglefinus*), Lemon Sole (*Pleuronectes microcephalus*), and plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Science* 28: 28-37. doi: 10.1111/j.1365-2621.1963.tb00155.x

- Kazbar, A.; Cogne, G.; Urbain, B.; Marec, H.; Le-Gouic, B.; Tallec, J.; Takache, H.;... Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39: 101432. doi: 10.1016/j.algal.2019.101432
- Khalil, Z.; Asker, M.; El-Sayed, S.; Kobbia, I. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 1225-1231. doi: 10.1007/s11274-009-0292-z
- Konosu, S. (1979). The taste of fish and shellfish. (Editado por Konosu, S.), *Food taste chemistry* (p. 115-185). Washington D.C., Estados Unidos: ACS.
- Konosu, S. & Yamaguchi, K. (1982). The flavor components in fish and shellfish (Editado por Martin, R.E.; Flick, G.J.; Hebard, C.E. & Ward, D.R.), *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* (p. 367-404). Connecticut, Estados Unidos: AVI.
- Krauss, M.; Longrée, P.; Dorusch, F.; Ort, C., Hollender, J. (2009). Occurrence and removal of N-nitrosamines in wastewater treatment plants. *Water Research*, 43: 4381-4391. doi: 10.1016/j.watres.2009.06.048
- Lee, T.; Tseng, Y.; Cheng, Ch.; Chen, Y.; Lin, Ch.; Su, H.;... Chang, Jo. (2017). Characterization of a heat-tolerant *Chlorella* sp. GD mutant with enhanced photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation efficiency and its implication as lactic acid fermentation feedstock, 10: 1-12. doi: 10.1186/s13068-017-0905-y
- Lincoln, E. & Earle, J. (1990). Wastewater treatment with microalgae (Editado por Akatsuka), *Introduction to Applied Phycology* (p. 429-446). The Hague, Holanda: SPB.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). Crecimiento microbiano. Editado por Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (Ed. 10°). *Biología de los microorganismos* (p. 137-166). Illinois, Estados Unidos: Pearson Prentice Hall.
- Mallick, N. & Rai, L. (1994). Removal of inorganic ions from wastewater by immobilized microalgae. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 10: 439-443. doi: 10.1007/BF00144469

- Mara, D.D. & Pearson, H. (1986). Artificial freshwater environment: Waste stabilization ponds. En: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology*, vol. 8, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 177-206. Recuperado de: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1319562X12000332?token=F0AD952B24AA31BCB4F2F03AC95ED76D1FE2D96AC33E2266643AF05C634D26CFBAFA1E17B50912CA39228C82DFB5BC2C>
- Mariátegui, L. & Taipe, A. (1996). Distribución y abundancia relativa del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Perú. Informe Progresivo N° 34 del Instituto del Mar del Perú.
- Martínez, M.E.; Sánchez, S.; Jiménez, J.M.; El Yousfi, F.; Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73: 263-272. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2
- Márquez-Ríos, E.; Morán-Palacios, E.; Lugo-Sánchez, M.; Ocano-Higuera, V.; Pacheco-Aguilar, R. (2007). Postmortem biochemical behavior of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle stored in ice and its relation with quality parameters. *Journal of Food Science*, 72: 356-362. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00468.x
- Mayhead, E.; Silkina, A.; Llewellyn, C.; Fuentes-Grünewald, C. (2018). Comparing nutrient removal from membrane filtered and unfiltered domestic wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Biology*, 7 (12): 1-21. doi: 10.3390/biology7010012
- Maza, S.; Solari, A.; Albrecht-Ruiz, M. (2007). Reducción de la intensidad del sabor ácido amargo de la papa mediante lavados con soluciones ácidas y neutralizantes. *Boletín de Investigación Instituto Tecnológico Pesquero Perú*, 8: 23-29. Recuperado de: <http://repositorio.itp.gob.pe/handle/ITP/27>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente - MAGRAMA (2013). Aplicación de las microalgas: estado de la técnica. España. AST Ingeniería. Recuperado de: <http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/04/guiamalgas.pdf>
- Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (2019). Reporte mensual de comercio, febrero 2019. Recuperado de <https://www.mincetur.gob.pe/wp->

content/uploads/documentos/comercio\_exterior/estadisticas\_y\_publicaciones/estadisticas/exportaciones/2019/RMC\_Febrero\_2019.pdf

- Ministerio de la Producción - PRODUCE (2017). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2017. Recuperado de [http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca\\_2017.pdf](http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf)
- Molinuevo-Salces, B.; Riaño, B.; Hernández, D.; Cruz, M. (2019). Microalgae and wastewater treatment: Advantages and disadvantages. *Microalgae Biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment*, 20: 505-534. doi: [doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_20)
- Monterroso J. (2011). Estudio de los efluentes del procesamiento de pota en Piura y su potencial uso como fertilizante (Tesis de bachiller, Universidad de Piura, Perú). Recuperado de: <https://pirhua.udep.edu.pe/handle/11042/1489>
- Nigmatullin, Ch.M.; Nesis, K.N.; Arkhipkin, Al. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 54: 9-19. doi: [10.1016/S0165-7836\(01\)00371-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00371-X)
- Nozaki, M. & Miyahara, S. (1974). Inorganic ingredients. Editado por Sugiyama, M., Utilization of squid (p. 87-88). Tokyo, Japón. A.A. Balkema.
- Oliveros, E. (2017). Biodegradation of squid processing wastewater for reutilization (Tesis de maestría inédita). Universidad Nacional de Pukyong, Corea del Sur.
- Oswald, W.; Asce, A.; Gotaas H.; Asce, M. (1852). Photosynthesis in sewage treatment. *American Society of Civil Engineers Transactions*, 2849: 73-105. Recuperado de: [http://content-calpoly-edu.s3.amazonaws.com/ceenve/1/images/57\\_photosynthesis\\_in\\_sewage\\_treatment.pdf](http://content-calpoly-edu.s3.amazonaws.com/ceenve/1/images/57_photosynthesis_in_sewage_treatment.pdf)
- Paes, C.; Faria, G.; Tinoco, N.; Castro, D.; Barbarino, E.; Lourenco, S. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 275-292. doi: [10.3856/vol44-issue2-fulltext-9](https://doi.org/10.3856/vol44-issue2-fulltext-9)

- Pariona, C. (2011). Desarrollo de indicadores de calidad del manto de *Dosidicus gigas* “pota” (Tesis de bachiller, Universidad Nacional Federico Villarreal, Perú).
- Park, E.; Enander, R.; Barnett, S.M.; Lee, Chong. (2001). Pollution prevention and biochemical oxygen demand reduction in a squid processing facility. *Journal of Cleaner Production*, 9: 341-349. doi: 10.1016/S0959-6526(00)00074-3
- Perez-Garcia, O.; Escalante, F.; de-Bashan, L.; Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water research*, 45: 11-36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Taylor, C. (1949). The Effect of phosphorus on decomposition of organic matter in fresh water. *Journal of Applied Microbiology*, 12 (2): 96-99. doi: 10.1111/j.1365-2672.1949.tb03883.x
- PROMPERÚ (2018). Informe Anual 2018 - Desarrollo del comercio exterior pesquero y acuícola. Recuperado de: <http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/sectoresproductivos/DP2018%20VFinal.pdf>
- Ramirez-Suarez, J.C.; Santiz-Gómez M.A.; Pacheco-Aguilar, R.; Scheuren-Acevedo, S.M.; García-Sifuentes, C.O.; Robles-Ozuna, L.E.; Martínez-Porchas, M.; Carvallo-Ruiz, M.G. (2014). Spray-Drying Effect of the Soluble Solids from an Effluent Produced by Cooking Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle Muscle. *Drying Technology*, 32: 1200-1209. doi: 10.1080/07373937.2014.890213
- Ramos, R. & Pizarro, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53: 75-86. doi: 10.4067/S0718-19572018000100075
- Richmond, A. & Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal – Applied Phycology and Biotechnology* (2° Edición). Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Rocha, F. & Vega, M. (2003). Overview of cephalopod fisheries in Chilean waters. *Fisheries Research*, 60: 151-159. doi: 10.1016/S0165-7836(02)00080-2

- Rodríguez, L.; Gómez, L.; Peraza, Y. (2014). Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de vinaza. Revista Centro Azúcar, 41: 75-81. Recuperado de: <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroazucar/2014/vol41/no4/9.pdf>
- Romero, T. (2012). Riles orgánicos pesqueros para el cultivo de *Chlorella* spp. y *Moina* sp. y sus características físico-químicas. Ingeniería Hidráulica y Ambiental Vol. XXXIII: 84-93. Recuperado de: <http://riha.cujae.edu.cu/index.php/riha/article/view/99/100>
- Rosas-Romero, Z.; Ramirez, J.; Pacheco, R.; Lugo, M.; Carvallo, G.; García, G. (2010). Partial characterization of an effluent produced by cooking of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. Bioresource Technology, 101: 600-605. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.074
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente (Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia, España). Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20T esina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
- Salcedo, F. (2015). Elaboración de hojuela dulce a partir del manto molido de pota (*Dosidicus gigas*) con quinua (*Chenopodium quinoa*) (Tesis de bachiller, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/936>
- Salgueiro, J.L. (2018). Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal (Tesis doctoral, Universidad de Vigo, España). Recuperado de: <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1158>
- Salvo, G. (2016). Estudio del procesamiento de aleta de pota (*Dosidicus gigas*) cocida y coloreada con achiote (Tesis de bachiller, Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2683>

- Shi, X.; Zhang, Xue.; Chen, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 312-318. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00208-8
- Shirai, T.; Kikuchi, N.; Matsuo, S.; Inada, H.; Suzuki, T.; Hirano, T. (1997). Extractive components of the squid ink. *Fisheries Science*, 63: 939-944. Recuperado de: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/fishsci1994/63/6/63\\_6\\_939/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fishsci1994/63/6/63_6_939/_pdf)
- Singh, R.; Birru, R.; Sibi, G. (2017). Nutrient removal efficiencies of *Chlorella vulgaris* from urban wastewater and reduced eutrophication. *Journal of Environmental Protection*, 8: 1-11. doi: 10.4236/jep.2017.81001
- Stevenson, R.J.; Bothwell M.L.; Lowe R.L. (1996). Periphyton responses to temperature at different ecological levels and Nutrients. Editado por Stevenson, R.J.; Bothwell M.L.; Lowe R.L. *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems* (p. 149-227). California, Estados Unidos: Academic Press.
- Su, Y.; Mennerich, A.; Urban, B. (2012). Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology*, 124: 157-162. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.037
- Sugiyama, M.; Kousu, S.; Hanabe, M.; Okuda, Y. (1989). Chemical properties. Editado por Sugiyama, M., *Utilization of squid* (p. 84-87). Tokyo, Japón. A.A. Balkema.
- Talbot, P. & De la Noüe, J. (1993). Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research* 27: 153-159. doi: 10.1016/0043-1354(93)90206-W
- Tam, N.; Lau, P.; Wong, Y. (1994). Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Science Technology*, 30: 369-374. doi: 10.2166/wst.1994.0288
- Tejada-Benítez, L.; Henao-Argumedo, D.; Alvear-Alayón, M.; Castillo-Saldarriaga, C. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería*, 24: 43-54. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfing/v24n39/v24n39a05.pdf>

- Tenorio, L.; Hernández, H.; Aguirre, M. (2018). Manual para obtención de cepas de microalgas. Informe ISSN 0378-7702 IMARPE, 45: 277-291. Recuperado de: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/3285>
  
- Van den Hoek, C.; Mann, D.; Jahns, H. (1995). *Algae – An Introduction to Phycology* (1° Edición). Nueva York, Estado Unidos: Cambridge University Press
  
- Vandamme, D.; Foubert, I.; Muylaert, K. (2013). Flocculation as low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31: 233-239. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.005
  
- Wang, L.; Min, M.; Li, Y.; Chen, P.; Chen, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemical Biotechnology*, 162: 1174-1186. doi: 10.1007/s12010-009-8866-7
  
- World Health Organization-WHO (2011). Nitrate and Nitrite in drinking water. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, 3 p. Recuperado de: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf)
  
- Yang, S.; Liu, G.; Meng, Y.; Wang, P.; Zhou, S.; Shang, H. (2014). Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 172: 180-185. doi: 10.1016/j.biortech.2014.08.122
  
- Zhu, C.J. & Lee, Y.K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9: 189-194. doi: 10.1023/A:1007914806640

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Estandarización de las ecuaciones de crecimiento celular para la microalga *Chlorella* sp.

Los datos de densidad celular y biomasa seca del ensayo sirvieron para realizar el análisis de correlaciones y estandarizar posteriormente, las ecuaciones de crecimiento para la microalga *Chlorella* sp.

De estos análisis, se seleccionó la mejor correlación para densidad celular ( $Y_D$ ) y biomasa seca ( $Y_B$ ), obteniendo las siguientes ecuaciones lineales:

$$Y_D = 77.1X - 14.445$$

Dónde:

$Y_D$ : Densidad celular expresada en  $10^6$  (cel/mL)

X: La densidad óptica (DO) de muestras de cultivo a 686 nm. Ecuación tomada del control.

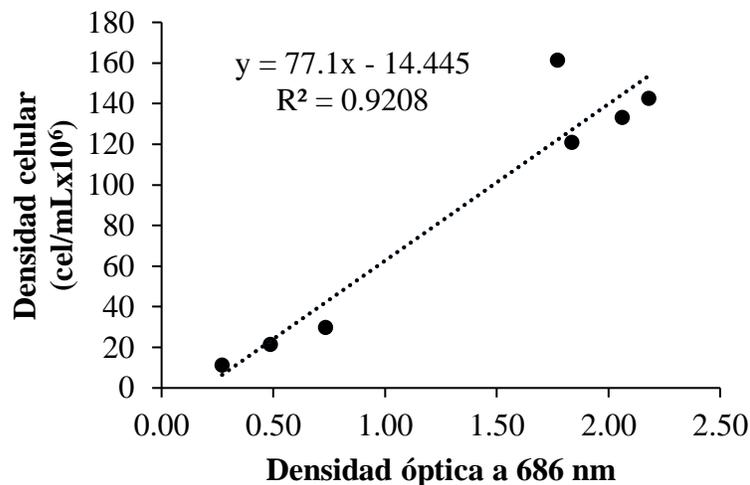


Figura 19. Relación entre la densidad celular promedio y las densidades ópticas de *Chlorella* sp.

$$Y_B = 0.195X + 0.0436$$

Dónde:

$Y_B$ : Biomasa seca (g/mL)

$X$ : La densidad óptica (DO) de muestras de cultivo a 686 nm.

Ecuación tomada del control.

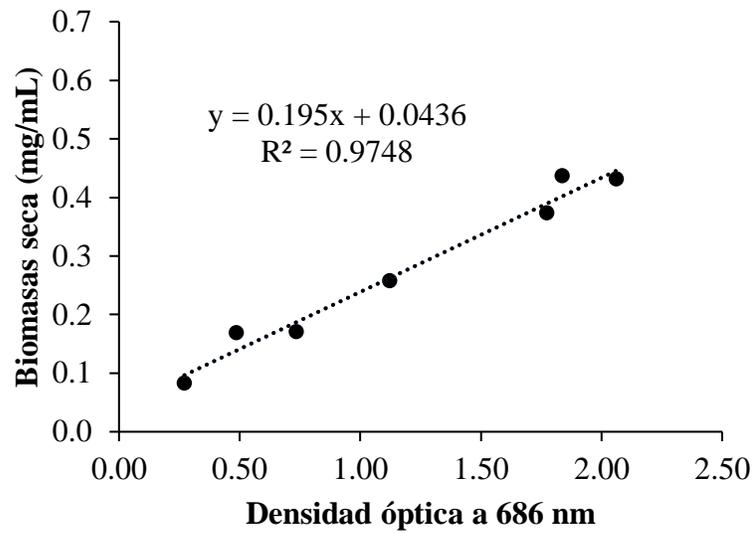


Figura 20. Relación entre la biomasa seca promedio y las densidades ópticas de *Chlorella* sp.

**Anexo 2.** Composición química del nutriente foliar líquido Bayfolan

<b>Nutriente foliar líquido 11-8-6 (N-P-K)</b>	
Nitrógeno total (N)	110 g/L
Anhídrido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	80 g/L
Oxido de Potasio (K <sub>2</sub> O)	60 g/L
Hierro (Fe)	190 mg/L
Manganeso (Mn)	162 mg/L
Boro (B)	102 mg/L
Cobre (Cu)	81 mg/L
Zinc (Zn)	61 mg/L
Molibdeno (Mo)	9 mg/L
Cobalto (Co)	3.5 mg/L
Vitamina B1	4 ppm
Hormonas de crecimiento	4 ppm

**Anexo 3.** Distribución del screening para la determinación de la concentración adecuada del agua de precocción del manto de pota: a) Cultivo de *Chlorella* sp., en el agua de precocción de pota, día 1; b) Cultivo de *Chlorella* sp., en el agua de precocción de pota, día 4; c) Cultivo de *Chlorella* sp., en el agua de precocción de pota, día 7.



**Anexo 4.** Procedimiento para obtención de efluente de la precocción del manto de *Dosidicus gigas* “pota” y distribución del ensayo: (a) Manto de pota; (b) Precocción del manto; (c) Agua de precocción obtenido a partir del manto de pota; (d) Distribución final de los diferentes tratamientos del agua de precocción del manto de pota en condiciones de invernadero.

