



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO EN EL CONTENIDO DE CLOROFILA Y ÁCIDOS GRASOS EN 3  
ESPECIES DE MICROALGAS MARINAS SOMETIDAS A ESTRÉS POR  
DETRIMENTO DE NUTRIENTES.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
ANDRÉS CLAIRIN SAVAGE**

**TUTOR PRINCIPAL  
DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO, FACULTAD DE QUÍMICA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA, FACULTAD DE QUÍMICA  
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Ciudad de México. Marzo, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Gálvez Mariscal María Amanda.

**Secretario:** Trujillo Roldán Mauricio Alberto.

**Vocal:** Alva Martínez Alejandro Federico.

**Vocal:** Carmona Jiménez Javier

**Vocal:** Hernández Becerril David Uriel.

.

Sitio donde se desarrolló el proyecto:  
Laboratorio de Microbiología Experimental  
Facultad de Química, UNAM

---

Dr. Víctor Manuel Luna  
Pabello

Asesor del tema

---

QFB Andrés Clairin Savage

Sustentante

## Agradecimientos

Se reconoce el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), como becario número (740530/596615) durante la realización de este trabajo.

Se reconoce el apoyo para la realización del presente trabajo a través de los proyectos DGAPA PAPIIT IT202818 “Desarrollo de una estrategia para el tratamiento de aguas residuales de maricultura empleando microalgas y aprovechamiento de la biomasa producida” así como el PAIP (VMLP) 50009111 otorgado por la Facultad de Química.

Se reconoce el apoyo otorgado por el PAEP para el curso “Taller teórico práctico de bioreactores para la producción de biomasa y pigmentos usando microalgas como materia prima” impartido en La Paz, Baja California.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por la oportunidad de realizar este trabajo.

Se reconoce el apoyo técnico brindado por el Dr. Manuel Sacristán de Alva y la alumna Alejandra Arreola.

Se reconoce la extraordinaria labor del jurado asignado para la revisión de este trabajo.

Se reconoce el apoyo técnico brindado por el M. en C. Luciano Hernández Gómez

Se reconocen las menciones y sugerencias realizadas por el Dr. Pedro Alejandro Melgoza.

Se reconoce el apoyo técnico brindado por el Dr. De la Rosa y M. en C. Pavel Pabello por su apoyo con el cromatógrafo de gases. También agradezco al M. en C. Luis Manuel Serrano y Dra. Julieta Hernández por su ayuda técnica en el duplicado del perfil de ácidos grasos.

Se reconoce el apoyo brindado por la Dra. Bertha Olivia Arredondo y la Dra. Laura Palau del CIBNOR en La Paz, Baja California Sur por su apoyo en el perfil de ácidos grasos. También se reconoce el apoyo del Dr. Sergio Rodríguez de la Unidad Académica de la UNAM en SISAL, Yucatán por proporcionar la cepa de *Tetraselmis sp.*

Se reconoce al Dr. David Hernández Becerril por el apoyo en el curso de ficología 2019.

Se reconoce a la alumna de servicio social Citlalli Mendoza Reza por la toma de fotografías para este trabajo.

# ÍNDICE

Lista de Figuras y Tablas	8
Lista de Abreviaturas.	11
Resumen.	12
<b>1. Introducción.</b>	<b>15</b>
<b>2. Marco teórico.</b>	<b>17</b>
2.1. <i>Biorefinerías.</i>	17
2.2. <i>Bioenergéticos.</i>	18
2.2.1. <i>Producción de Biodiesel mediante microalgas marinas.</i>	20
2.3. <i>Lípidos microalgales como alimento.</i>	23
2.4. <i>Especies de microalgas marinas para la producción de lípidos.</i>	25
2.5. <i>Síntesis de lípidos en microalgas.</i>	26
2.6. <i>Clorofila, metabolismo e importancia en condiciones de estrés.</i>	28
2.7. <i>Cultivo de microalgas marinas.</i>	30
2.7.1. <i>Presencia de CO<sub>2</sub>.</i>	30
2.7.2. <i>Importancia del pH</i>	30
2.7.3. <i>Importancia de la intensidad lumínica.</i>	30
2.7.4. <i>Mecanismos de remoción de nutrientes.</i>	31
<b>3. Objetivos e hipótesis</b>	<b>37</b>
3.1 <i>Objetivos generales.</i>	35
3.2 <i>Objetivos particulares.</i>	35
3.3 <i>Hipótesis.</i>	35
<b>4. Metodología</b>	<b>37</b>

4.1 Estrategia de trabajo	37
4.2. Selección de especies de microalgas para experimentar.	40
4.3. Cultivo de las especies de algas seleccionadas.	40
4.4. Determinación de nutrientes.	42
4.5. Determinación de lípidos	44
4.6. Determinación de clorofila.	44
4.7. Determinación de producción de biomasa microalgal.	45
4.8. Extracción de lípidos contenidos en la biomasa de las microalgas.	47
4. 9. Perfil de ácidos grasos.	48
4.9.1. Derivatización.	48
4.9.2. Análisis cromatográfico.	49
4.9.3. Identificación de ácidos grasos.	50
4.9.4. Cuantificación.	50
4.10. Diseño experimental.	51
<b>5. Resultados</b>	<b>53</b>
5.1. Cultivo de las microalgas	53
5.1.1. Cultivo de <i>Tetraselmis sp</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	54
5.1.1.1. Potencial de hidrogeno (pH) y temperatura para <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	55
5.1.1.2.Crecimiento de <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis</i> <i>sp.</i>	58
5.2 Producción de lípidos, biomasa y clorofila con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	62
5.2.1. Relación entre producción de biomasa, lípidos y clorofila con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	66
5.2.2. Comparación entre la producción de lípidos descrita en la bibliografía y los resultados obtenidos con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	71

5.3. Remoción de nutrientes: remoción de nitrógeno con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	73
5.4 Remoción de ortofosfatos con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	76
5.5. Determinación de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) en cultivos con <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	77
5.6. Segundo experimento <i>Tetraselmis sp</i> en medio con carbono inorgánico	79
5.6.1. Cultivo y crecimiento de <i>Tetraselmis sp.</i> en el segundo experimento	80
5.7 Producción de lípidos, clorofila y biomasa con <i>Tetraselmis sp.</i>	83
5.8. Remoción de nutrientes con <i>Tetraselmis sp.</i>	85
5.8.1. Remoción de nitrógeno con <i>Tetraselmis sp.</i>	85
5.8.2. Remoción de ortofosfatos con <i>Tetraselmis sp.</i>	86
5.8.3. Determinación de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) para cultivo de <i>Tetraselmis sp.</i>	87
5.9. Extracción de lípidos.	88
5.10. Análisis cromatográfico <i>Tetraselmis sp.</i>	89
<b>6. Conclusiones</b>	<b>94</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>96</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>98</b>
7.1. Referencias electrónicas	105
<b>ANEXO</b>	<b>108</b>
I-1 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para biomasa. Lípidos y clorofila primera fase	108
<b>I-2 Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para biomasa, lípidos, y clorofila segunda fase.</b>	<b>115</b>

## Lista de Figuras y Tablas.

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo para procesos del biodiesel (Loera-Quezada <i>et al.</i> , 2010).	18
<b>Figura 2.</b> Transesterificación o alcoholisis (Hernández <i>et al.</i> , 2009).	20
<b>Figura 3.</b> Biosíntesis de lípidos microalgales (Tomado de Rosenberg <i>et al.</i> , 2008).	27
<b>Figura 4.</b> Estrategia de trabajo.	39
<b>Figura 5.</b> Modelo de cultivo (González-Palma, datos sin publicar)	41
<b>Figura 6.</b> Cuadrantes de la cámara de Neubauer (Bastidas, 2012).	46
<b>Figura 7.</b> Cultivos (A) <i>Tetraselmis sp.</i> , (B) <i>Nannochloropsis sp.</i> y (C) <i>Dunaliella sp.</i> en cámara de cultivo del laboratorio de microbiología experimental.	53
<b>Figura 8.</b> Células (A) <i>Dunaliella sp.</i> , (B) <i>Tetraselmis sp.</i> y (C) <i>Nannochloropsis sp.</i> Microfotografía tomada con L3201 LED epifluorescence Canon Dsr1 HD x100 x10 realizadas por la alumna de servicio social Citlalli Mendoza Reza.	54
<b>Figura 9.</b> Variación del pH en los cultivos con de (A) <i>Tetraselmis sp.</i> , (B) <i>Dunaliella sp.</i> y (C) <i>Nannochloropsis sp.</i> con carbón orgánico e inorgánico a 900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (std=3).	57
<b>Figura 10:</b> Crecimiento en logaritmo natural (Ln) de biomasa seca por especie: <i>Tetraselmis sp.</i> (A), <i>Dunaliella sp.</i> (B) y <i>Nannochloropsis sp.</i> (C) (std=3).	58
<b>Figura 11:</b> Comparación de crecimiento de biomasa por densidad de flujo de fotones 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A), 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B) y 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (C). (std=3)	60
<b>Figura 12.</b> Comparación de producción de lípidos: 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A), 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B) y 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (C) (std=3).	62
<b>Figura 13.</b> Comparación de producción de clorofila: 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A), 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B) y 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (C)(std=3).	64



<b>Figura 14.</b> Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con <i>Tetraselmis sp.</i> (A) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (B) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (C) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (D) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (E) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ y (F) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (std=3).	67
<b>Figura 15.</b> Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con <i>Dunaliella sp.</i> (A) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (B) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ ,(C) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (D) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (E) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ y (F) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (std=3)	68
<b>Figura 16.</b> Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con <i>Nannochloropsis sp.</i> (A) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (B) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ ,(C) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ , (D) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (E) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.O.}$ y (F) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (std=3)	69
<b>Figura 17.</b> Remoción de nitrógeno con <i>Tetraselmis sp.</i> (A) Remoción de nitrato, (C) remoción de nitrito y (E) remoción de amonio, con <i>Dunaliella sp.</i> (B) Remoción de nitrato, (D) remoción de nitrito y (F) remoción de amonio y con <i>Nannochloropsis sp.</i> (G) Remoción de nitrato, (H) remoción de nitrito y (I) remoción de amonio (std=3).	73
<b>Figura 18.</b> Remoción de ortofosfatos con <i>Tetraselmis sp.</i> (A) <i>Dunaliella sp.</i> , (B) y (C) <i>Nannochloropsis sp.</i> (std=3).	76
<b>Figura 19.</b> Remoción de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) para <i>Tetraselmis sp.</i> (A) <i>Dunaliella sp.</i> , (B) y (C) <i>Nannochloropsis sp.</i> (std=3).	77
<b>Figura 20.</b> Variación del pH en los cultivos con <i>Tetraselmis sp</i> (std=3)	80
<b>Figura 21.</b> Conteo celular (A) y peso seco de <i>Tetraselmis sp</i> (B) (std=3)	80
<b>Figura 22.</b> Cinética de crecimiento mediante la sumatoria de tasas de crecimiento de <i>Tetraselmis sp.</i> (std=3).	82
<b>Figura 23.</b> Tiempo de generación de <i>Tetraselmis sp.</i> (std=3).	82
<b>Figura 24.</b> Producción de clorofila (A) y lípidos (B) para <i>Tetraselmis sp.</i> (std=3)	83

<b>Figura 25.</b> Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con <i>Tetraselmis sp.</i> (A) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (B) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (C) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (D) Control 34 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (std=3).	84
<b>Figura 26.</b> Remoción nitrógeno con <i>Tetraselmis sp.</i> : (A) Amonio, (B) nitrato y (C) nitrito (std=3).	86
<b>Figura 27.</b> Remoción de ortofosfatos con <i>Tetraselmis sp.</i> (std=3).	87
<b>Figura 28.</b> Perfil de contenido de materia organica disuelta medido como DQO para cultivo de <i>Tetraselmis sp.</i> (std=3).	87
<b>Figura 29.</b> Cromatograma muestra (A) 900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , (B) 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .(C) 2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .(D) Control.	92
<b>Tabla 1 .</b> Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México (CIA World Factbook, 2009; Schenk et al., 2008).	22
<b>Tabla 2.</b> Condiciones del método cromatográfico	49
<b>Tabla 3.</b> Método para espectros de masas.	49
<b>Tabla 4.</b> Productividades <i>Tetraselmis sp.</i>	65
<b>Tabla 5.</b> Productividades <i>Dunaliella sp.</i>	66
<b>Tabla 6.</b> Productividades <i>Nannochloropsis sp.</i>	66
<b>Tabla 7.</b> Contenido de aceites de algunas especies de microalgas (Tomado de Loera-Quezada et al., 2010)	72
<b>Tabla 8.</b> Remoción de nutrientes de <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Dunaliella sp.</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	79
<b>Tabla 9.</b> Productividades <i>Tetraselmis sp</i> segundo experimento.	85
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de remoción más altos de <i>Tetraselmis sp.</i> a cuatro distintas densidades de flujo de fotones.	88
<b>Tabla 11.</b> Concentración de ácidos grasos CIBNOR ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ).	89
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de ácidos grasos para <i>Tetraselmis sp.</i>	90

## Lista de abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
ARR	Agua residual real
ARS	Agua residual sintetica
BAS	Sustancias Bioactivas
C	Carbono
C°	Grados Celsius
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C.O.	Carbono Orgánico
C.I.	Carbono Inorgánico
D	<i>Dunaliella sp.</i>
DQO	Demanda Química de Oxigeno
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAME	Fat acid methyl ester
GEI	Gases de efecto invernadero
g	Gramo
G	Gravedades
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HC	Hidrocarburos
L	Litro
pH	Potencial de Hidrógeno
Ppm	Partes por millón
ML	Millones de litros
mL	Mililitros
MP	Material particulado
N	Nitrógeno
N	<i>Nannochloropsis sp.</i>
NED	N-1 naftilendiamida
Nm	Nanómetro
NO <sub>x</sub>	Óxidos de nitrógeno
P	Fosforo
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
S	Azufre
SO <sub>x</sub>	Óxidos de azufre
T	<i>Tetraselmis sp.</i>
TAG	Triacilgliceridos
900	900 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$
1500	1500 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$
2000	2000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

## RESUMEN.

El proyecto se centró en el estudio de tres especies de microalgas marinas, *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.* cultivadas en un medio similar a agua residual de cultivo de camarón para obtener la producción de lípidos y clorofila, bajo estrés por detrimento de nutrientes a diferentes condiciones de cultivo (tres densidades de flujo de fotones: 900, 1500 y 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y dos distintas fuentes de carbono: acetato de sodio con  $\text{CO}_2$  atmosférico (carbono orgánico o C.O.) y  $\text{CO}_2$  atmosférico (carbono inorgánico o C.I.) con el objetivo de conocer a que condiciones se produce mayor cantidad de lípidos, clorofila y biomasa y cómo es que se relacionan.

También se analizó la remoción de nutrientes (fosfatos, nitratos, nitritos, amonio y materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno) de los medios de cultivo de agua residual artificial.

Las microalgas cultivadas con carbono orgánico tuvieron una mayor producción de clorofila, siendo esto importante para la producción industrial de esta biomolécula y para conocer el tipo de metabolismo en el alga: *Tetraselmis sp.* C.O y C.I. a 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : 3.203  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 3.039  $\mu\text{g L}^{-1}$ , *Dunaliella sp.* C.O. y C.I. a 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : 10.551  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 4.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  y *Nannochloropsis sp.* C.O. y C.I. a 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : 4.373  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 2.742  $\mu\text{g L}^{-1}$ . *Dunaliella sp.* cultivada con carbono orgánico con 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  produjo la mayor cantidad de clorofila. *Tetraselmis sp.* cultivada con carbono inorgánico y una densidad de fotones de 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  alcanzó la mayor producción de lípidos: 151.5  $\text{mg L}^{-1}$ . *Nannochloropsis sp.* a 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico generó la mayor cantidad de biomasa al día 16 con 2.7  $\text{g L}^{-1}$ .

Las condiciones, la especie de microalga y tipo de fuente de carbono a la cual se obtuvo una mayor cantidad de lípidos, clorofila y biomasa son de importancia para poder diseñar un biorreactor y las condiciones adecuadas para maximizar la producción y la etapa de cosechado de cualquiera de estos productos de valor agregado, así como conocer la relación biomasa, lípidos clorofila, estando ligada la clorofila con las fases de crecimiento de la biomasa, mientras que los lípidos aumentan durante el estrés y la fase estacionaria. La remoción de nutrientes

además es alta, llegando en fosfatos al 95% en 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en *Tetraselmis sp.* y *Nannochloropsis sp.*

Posteriormente se prosiguió a realizar un duplicado del cultivo de *Tetraselmis sp.* en el medio de agua residual artificial de cultivo de camarón y tres concentraciones de luz diferentes (las mismas usadas previamente), pero se usó únicamente carbono inorgánico como fuente de carbono. Además, se adecuó una muestra control la cual se cultivó a una densidad de fotones de 34  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  siendo esta la densidad de fotones usada en el cultivo estándar de *Tetraselmis sp.* De este cultivo se determinó que la condición para una mayor producción de lípidos fue en 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (265  $\text{mg L}^{-1}$ ), al igual que también a estas condiciones se produjo la mayor cantidad de biomasa (1.91  $\text{g L}^{-1}$ ), mientras que a 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  produjo la mayor cantidad de clorofila (8.761  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Posteriormente se extrajeron los lípidos de la biomasa y se obtuvo el perfil de ácidos grasos mediante un análisis de cromatografía de gases, obteniéndose que 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtuvo la mayor concentración de ácidos grasos: 16:0= 45.60  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , 18:3 $\omega$ 3= 24.59  $\mu\text{g mg}^{-1}$ . La remoción de nutrientes además es alta, llegando en la remoción de ortofosfatos al 95% a 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  lo que indica que este tipo de cultivos son una herramienta prometedora para su uso en el tratamiento de aguas residuales por su alta remoción de nutrientes.

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**

## 1. Introducción

Los cultivos de microalgas marinas se han utilizado desde los últimos años para la producción de insumos alimenticios para humanos y animales como también para el uso de la biomasa en la producción de biocombustibles provenientes de lípidos (Maeda, 2018).

Los principales estímulos de estrés son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad, el pH del medio de cultivo, la temperatura y la intensidad luminosa (Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

Las microalgas sintetizan ácidos grasos los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutrales, ceras, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas (Hu *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo los lípidos neutrales son adecuados para la producción de biodiesel y de éstos, los triacilglicéridos son los más utilizados (Loera-Quezada *et al.*, 2010). El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007). La producción de clorofila “a” es un indicador del tipo de metabolismo que ocurre por el estrés por detrimento de nutrientes, dando información acerca del metabolismo que propicia una mayor productividad de lípidos. Además de que este pigmento también es de interés comercial ya que puede ser usado como colorante natural para alimentos.

En condiciones naturales las microalgas fotótrofas absorben la luz solar y asimilan el dióxido de carbono del aire (también pueden usar bicarbonato y acetato de sodio disuelto como fuente de carbono (Muñoz, 2015)) y los nutrientes de los ambientes acuáticos mediante la fotosíntesis (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2014). En los cultivos con estrés por detrimento de nutrientes se puede mejorar la producción de lípidos lo cual es importante en la producción de biodiesel. (Aldesanya *et al.*, 2014). El objetivo principal en el proyecto fue conocer el efecto que tiene el detrimento de nutrientes y la intensidad luminosa con respecto a la producción de lípidos y la producción de clorofila en las tres especies de microalgas marinas: *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.*

# **CAPÍTULO 2**

## **Marco teórico**



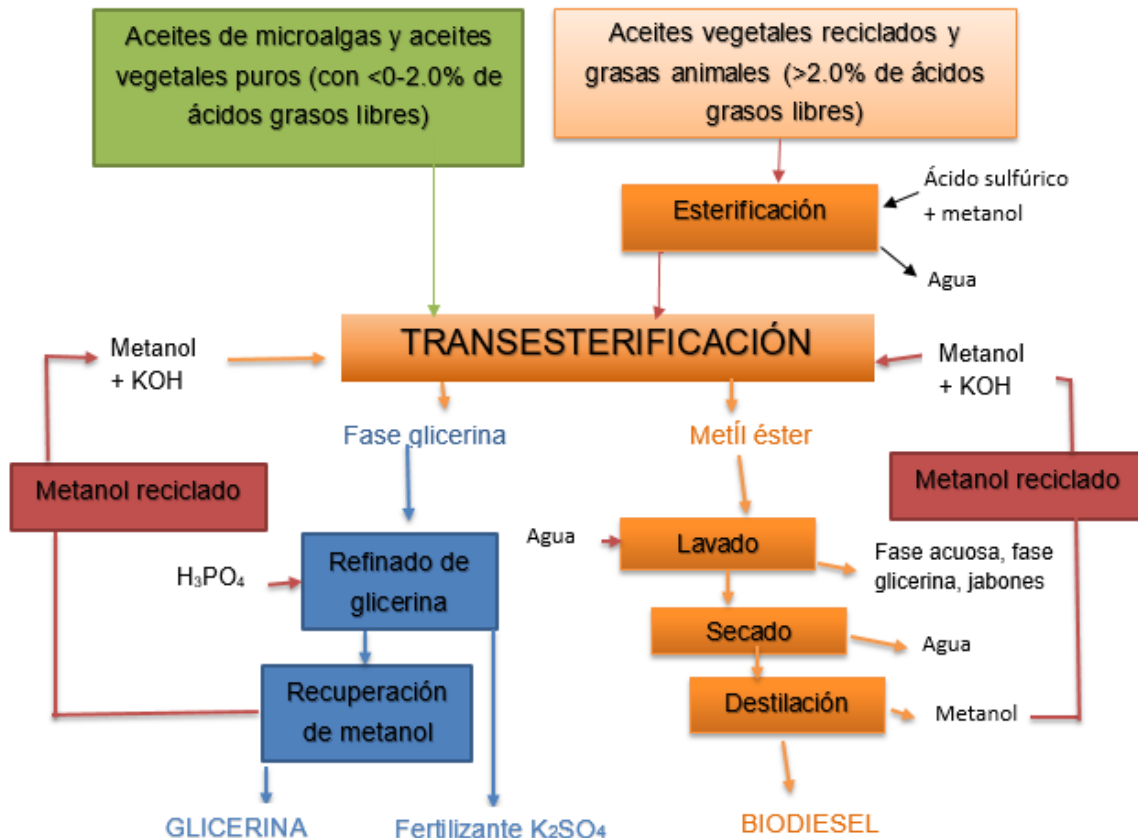
## 2. Marco Teórico

### 2.1. Biorefinerías.

El concepto de biorrefinación es similar al de refinerías de petróleo en que múltiples combustibles y productos químicos se obtienen utilizando el petróleo crudo como material de partida. Biorrefinería, por lo tanto, se define como el procesamiento de biomasa sostenible para obtener energía, biocombustibles y productos de alto valor agregado a través de procesos y equipos para la transformación de biomasa véase figura 1: Diagrama de flujo para procesos del biodiesel de Loera-Quezada *et al.*, (2010). También es importante tener en cuenta que el costo de la producción de microalgas es alrededor del 90% de la producción de biodiésel, esto indica que los esfuerzos en el desarrollo y la investigación deben centrarse en reducir los costos de producción de microalgas (Castillo *et al.*, 2017).

El costo de producir biodiésel puede ser teóricamente compensado por los ingresos generados por otros subproductos de la biomasa (Wang *et al.*, 2014). Las microalgas contienen cantidades significativas de proteínas y carbohidratos, así como pequeñas cantidades de compuestos funcionales de alto valor, por ejemplo, astaxantina, carotenos, clorofila, ácidos grasos libres y ácido linoleico. Cada uno de éstos puede ser utilizado para generar productos de interés industrial en una biorrefinería. Estudios recientes han concluido que la producción de biodiésel a escala industrial puede ser económicamente sostenible si la estrategia de la refinería se basara en la producción de biomasa (Wijffels y Barbosa, 2010).

En una biorrefinería, los lípidos crudos son fraccionados en compuestos de alto valor agregado y lípidos para biodiésel (acilgliceroles). Si las especies de microalgas contienen un alto nivel de proteínas, la biomasa residual de la producción de biodiésel puede ser utilizada como alimentación de ganado. Si la especie contiene altos niveles de carbohidratos, la biomasa residual puede ser fermentada para producir bioetanol (Castillo *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Diagrama de flujo para procesos del biodiesel (Loera-Quezada *et al.*, 2010).

## 2.2. Bioenergéticos.

Los bioenergéticos son una excelente opción a futuro como una fuente de energía renovable. Existen muchas fuentes de energía renovable tales como la energía solar, eólica, hidrotermal entre otras, pero una de las fuentes que se están desarrollando es la producción de bioenergéticos (Kligerman, 2015). Entre estos bioenergéticos se encuentra el biodiesel. El biodiesel es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos que se obtienen de fuentes renovables, como aceites vegetales o grasas animales y que se someten a un proceso de transesterificación. Esta reacción puede ser catalizada por álcalis, ácidos o enzimas (Canakci *et al.*, 2008).

En el mundo diversos países están desarrollando tecnologías para la producción de biodiesel, tales como Brasil (aceite de soja), Colombia (palma africana) la empresa neozelandesa Aquaflow Bionomic y la estadounidense Solazyme, que ambas están usando algas marinas para producir biodiesel, también países como Costa Rica, Argentina y Chile están investigando en este rubro (Olmedo, 2009).

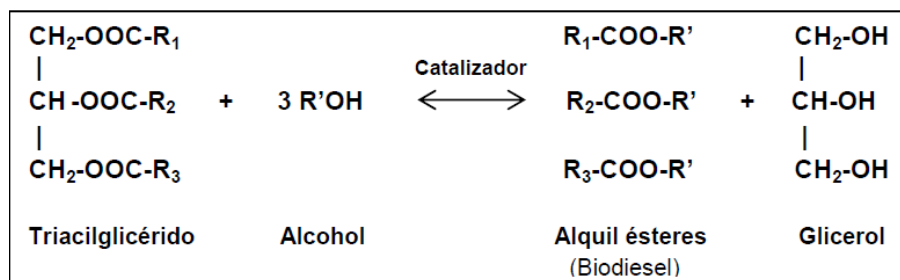
En México, el objetivo del Programa Especial para el Aprovechamiento de Energías Renovables es fomentar dichas fuentes energéticas y la producción de biocombustibles con un enfoque técnico, económico, ambiental y socialmente viable. El programa plantea aumentar el porcentaje de la capacidad instalada en el país de estas alternativas de energía limpia en 29 % de la capacidad de generación prevista para el 2018 (SENER, 2013).

Se han realizado varios estudios utilizando diferentes aceites como materia prima, distintos alcoholes, al igual que una variedad de catalizadores, incluyendo catalizadores homogéneos como el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y ácido sulfúrico, y catalizadores heterogéneos como las lipasas (Boey *et al.*, 2009; Raffat, 2011).

Las propiedades del biodiesel varían de acuerdo a la materia prima y entre las más sobresalientes y atractivas están su biodegradabilidad y no toxicidad, comparado con el diésel fósil. Frecuentemente, se considera que el balance de carbono en la producción de biodiesel a partir de biomasa (plantas y microalgas) es neutral (Costa *et al.*, 2018). Sin embargo, para mayor precisión, se debe tomar en cuenta el carbono utilizado en todo el ciclo de producción, respecto al liberado durante la combustión (Schenk *et al.*, 2008).

La razón principal por la cual los aceites vegetales no se pueden utilizar directamente en los motores diésel es por su alta viscosidad la cual está relacionada a su estructura química de triglicéridos, mientras que el diésel generalmente suele ser monoglicéridos. Conforme aumenta la longitud de la cadena carbonatada de los lípidos, mayor es la viscosidad. No obstante, la viscosidad disminuye cuando aumenta el número de enlaces dobles (grado de instauración) (Loeza-Quesada, 2010).

Existen cuatro procesos químicos que se utilizan para resolver el problema de la viscosidad: dilución, microemulsificación, pirolisis y transesterificación, siendo este último el más recomendado y preferido ya que se producen ácidos grasos y glicerol, además de ser más económico (Canakci y Sanli, 2008; Shales, 2007; Loeza-Quesada., 2010) véase figura 2: Transesterificación o alcoholisis de Hernández *et al.*, (2009).



**Figura 2.** Transesterificación o alcoholisis (Hernández *et al.*, 2009).

### 2.2.1. Producción de Biodiesel mediante microalgas marinas

Actualmente, la producción de biocombustibles de primera generación, como el bioetanol y el biodiesel, se producen a partir de plantas comestibles que crecen en tierra cultivable (Vasudevan y Briggs, 2008). La producción ha aumentado hasta el punto que los cultivos para producir biocombustibles están compitiendo con la producción de alimentos por lo cual no son sustentables.

Los biocombustibles de segunda generación derivados de materias primas lignocelulósicas y plantas no comestibles pueden parecer una mejor opción (Liu y Zhao, 2007), sin embargo, también se requiere tierra para su cultivo y el uso de energía para su transporte de las materias primas, lo que reduce el retorno neto de la energía (Gnansounou y Raman, 2016).

Las microalgas marinas son una materia prima para los biocombustibles de tercera generación, debido a que tienen tasas de crecimiento más altas que las plantas por lo cual requieren de una menor área de cultivo y no requieren de tierra cultivable para crecer (Abdelaziz *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2016).

Algunos parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son: que al producirse poca biomasa se producen pocos triacilglicéridos (Sajjadi *et al.*, 2018).

Este último parámetro determina el costo del proceso del cultivo, mientras que la concentración de biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de los procesos de extracción y transformación. Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li *et al.*, 2008).

Desafortunadamente esta situación ideal es difícil de encontrar en la práctica, ya que las células de microalgas con alto contenido de triglicéridos son producidas bajo condiciones de estrés fisiológico asociado a condiciones limitantes de nutrientes y, por lo tanto, de baja productividad de biomasa (Viêgas *et al.* 2015). Por lo anterior, los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodiesel con microalgas consisten en:

- a) Seleccionar las mejores cepas en términos de máximo contenido de lípidos y máxima productividad, mejor perfil de lípidos y adaptabilidad al tipo de agua a utilizar y a las condiciones ambientales.
- b) Establecer estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa.
- c) Lograr el uso de aguas residuales, evitando contaminaciones de otros microorganismos.
- d) Seleccionar el tipo de reactor más adecuado o una combinación de ellos, para máxima producción de biomasa al mínimo costo.
- e) Lograr abatir los costos de cosecha.
- f) Lograr una extracción de lípidos y su conversión a biodiesel, mediante estrategias de mínimo costo (Loera-Quezada *et al.*, 2010).

La ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas (Schenk *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009;

Rodolfi *et al.*, 2009). Así también la salinidad (Enamala, 2018) y el estrés por nitrógeno (Costa, 2018) aumentan la cantidad de ácidos grasos intracelulares.

Una de las estimaciones más conservadoras para el rendimiento anual de biodiésel microalgal, como se indica en la Tabla 1 de Schenk *et al.*, (2010), por lo menos duplica los rendimientos obtenidos a partir de plantas oleaginosas. En el 2008 la demanda de petrodiesel en México fue de 23,630 millones de litros, el reemplazo de esta demanda con biodiésel de origen vegetal, incluso con aquél derivado de cultivos de elevada productividad lipídica como la palma, requeriría de extensas regiones fértiles. Igualmente, el uso de plantas marginales como *Jatropha curcas*, precisaría de superficies mayores a las comprendidas por cultivos microalgales independientemente de la fertilidad de los suelos (Schenk *et al.*, 2008).

En la Tabla 1 se indican las proporciones de suelo fértil y de superficie total del país necesarias para reemplazar con biodiésel el 100% de la demanda de petrodiesel en México. Las fracciones de superficie total sólo se señalan para materias primas que no precisan de suelos fértiles (Schenk *et al.*, 2008).

**Tabla 1 .** Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiésel en México (Schenk *et al.*, 2008).

<b>Materia prima</b>	<b>Productividad De Biodiesel (L/ha/año)</b>	<b>Superficie equivalente requerida (ha x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Porcentaje equivalente de la superficie fértil requerida</b>	<b>Porcentaje equivalente de la superficie total (no necesariamente fértil) requerida</b>
Palma	5,950	3.972	16.14	--
Jatropha	1,892	12.490	50.75	6.43
Colza	1,190	19.859	80.69	--
Girasol	952	24.823	100.9	--
Soya	446	52.986	215.3	--
Microalgas <sup>a</sup>	12,000	1.969	8.00	1.01
Microalgas <sup>b</sup>	20,000	1.181	4.80	0.61

<sup>a</sup>Rendimiento conservador de productividad de biodiésel microalgal acorde con Schenk *et al.* (2008).

<sup>b</sup>Productividad de biodiésel microalgal asequible a través de la tecnología actualmente disponible, acorde con Wijffels (2010).

Las principales desventajas en la producción de biocombustibles a partir de

microalgas son que las algas unicelulares se encuentran en suspensión en los medios de cultivo, son difíciles de recolectar, la extracción de lípidos es compleja y todavía se encuentra en una etapa de desarrollo (Rawat-Kumar *et al.*, 2011).

### 2.3. Lípidos microalgales como alimento.

Las microalgas se han empleado en la alimentación del ser humano y en la acuicultura para alimentar diversos organismos marinos (Olivarría *et al.*, 2010). El fitoplancton y en especial las microalgas tienen una diversidad muy grande en lo que respecta a especies de lípidos, teniendo una gran cantidad de fosfolípidos, triacilgliceridos y ácidos grasos de cadenas saturadas e insaturadas con múltiples utilidades (Cañavate *et al.*, 2017).

En las dos últimas décadas evidencias médicas demuestran que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 previene enfermedades cardiovasculares (Shahidi y Miraliakbari, 2004), cáncer (Roynette *et al.*, 2004), infartos (Hankey y Jamrozik, 1996), diabetes (Seo *et al.*, 2005), enfermedades inflamatorias y desordenes neuropsiquiátricos (Roynett *et al.*, 2004).

Actualmente la mejor fuente de los PUFAs (Poly- Unsaturated Fatty Acids) son los alimentos de origen marino.

En países desarrollados como Australia, EEUU, o Reino Unido el consumo de alimentos de origen marino es muy bajo. En Australia, por ejemplo, la dosis media de consumo de los dos más beneficiosos PUFA omega-3, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), es 30 mg/día (Australian Bureau of Statistics, 1995). Sin embargo, no ha sido aún recomendada la dosis diaria para EPA y DHA. Por ejemplo, el rango puede variar desde 450 mg/día recomendado por la agencia de alimentación del Reino Unido, hasta los 500 mg/día por la Sociedad Internacional para el Estudio de los Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL), o 650 mg/día del combinado de EPA y DHA por grupos de expertos de Australia, quienes indicaron que el DHA debería representar un mínimo de 220 mg (Semopoulos *et al.*, 1999).

El contenido en lípidos de las microalgas se ve influenciado por los distintos factores ambientales en los que se desarrollan los cultivos, afectando tanto a la producción relativa de ácidos grasos como a su contenido total (Cerón, 2013).

Con respecto a la luz, no se puede decir que exista una pauta de comportamiento general y los efectos dependen de la especie en estudio. Sin embargo, en estudios realizados con *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum* se ha observado como el aumento de la intensidad media en el seno del cultivo favorece la poliinsaturación de los ácidos grasos, además de reducirse el contenido en lípidos totales (Molina Grima *et al.*, 1994).

Respecto al nitrógeno, su limitación en el medio hace aumentar la síntesis de lípidos en las microalgas. Sin embargo, aunque el contenido en lípidos puede aumentar con esta limitación, la eficiencia de los cultivos disminuye debido a la menor productividad de biomasa originada por reducirse la velocidad de crecimiento.

Pohl (1974) informa que para el fitopláncton marino, concentraciones de nitrógeno en el agua superiores a 400  $\mu$ molar favorecen la síntesis de PUFAs, mientras que, por debajo de esta, se ven favorecidos los ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

También existen variaciones en los ácidos grasos encontrados en función de la especie estudiada. Así, *Porphyridium cruentum* y *Porphyridium aerugineum* poseen altos niveles de ácido araquidónico (20:4n6), palmítico (16:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2n6). En cambio, las crisofíceas tienen altos contenidos relativos de docosahexaenoico (22:6n3), y docosatetraenoico (22:4n6) (Cerón, 2013).

El ácido eicosapentaenoico tiene importantes aplicaciones comerciales en el mercado de alimentos dietéticos, se utiliza como complemento alimentario en acuicultura y como sustrato de síntesis en la industria farmacéutica. Las ventajas de las microalgas como fuente de EPA son diversas, en primer lugar, el EPA obtenido a partir de microalgas se encuentra libre de colesterol, así como de diferentes tóxicos que tienden a acumularse en las grasas del pescado (actualmente el aceite de pescado es la fuente de EPA más usada) (Cerón, 2013).

*Nannochloropsis gaditana*, por ejemplo, crece y permanece estable en los estanques de agua de mar al aire libre durante varios meses, es naturalmente



acuosa y produce ácido eicosapentaenoico, un ácido graso poliinsaturado omega-3 de gran valor nutricional (Matthew C. Posewit., 2017).

*Nannochloropsis oculata* tiene una excelente composición y contiene todos los aminoácidos esenciales requeridos para la alimentación animal, se conoce que contiene una alta concentración de ácido eicosapentaenoico (215 g / kg de grasa total) y de ácido docosahexaenoico (32 g / kg de grasa), los cuales al incluirlos en la dieta pueden aumentar el valor nutritivo de los productos finales de la producción de rumiantes (por ejemplo, leche y carne) y mejorar el rendimiento animal con varios efectos beneficiosos para la salud humana (Gomaa *et al.*, 2018).

#### 2.4. Especies de microalgas marinas para la producción de lípidos.

Entre las principales características deseables para cultivos a gran escala están: crecimiento rápido, alto contenido de productos de alto valor agregado, desarrollo en ambientes extremos, células grandes en colonias o filamentos, gran tolerancia a altos niveles de CO<sub>2</sub> (15% o más), a contaminantes, resistentes a fotoinhibición y al efecto físico de la agitación o turbulencia. Además, no debe excretar auto inhibidores (Griffiths y Harrison, 2009).

El género *Nannochloropsis* y su utilidad en la formación de lípidos ha sido estudiando en el pasado (Boussiba *et al.*, 1987; Chini Zittelli *et al* 1999; Hu y Gao 2006). Con excepción de *Nannochloropsis salina* (Boussiba *et al.*, 1987) en general el género *Nannochloropsis sp* aumenta la cantidad de lípidos (triacilgliceridos) como consecuencia de la privación de nutrientes, en especial del nitrógeno.

*Tetraselmis spp.* es capaz de acumular una gran cantidad de lípidos, sobre todo bajo estrés por nitrógeno (Teo *et al.*, 2014), que pueden extraerse y utilizarse para la producción de biodiesel, además, es una de las mejores productoras de biomasa y produce BAS (Sustancias Bioactivas) que están asociados con actividades biológicas y posibles beneficios para la salud (Amna Kashif S. *et al*, 2018).

*Dunaliella* también ha presentado una alta producción de ácidos grasos neutros al ser sometidos a una baja nutricional de nitrógeno en el medio de cultivo (Borowitzka, 1988).

*Dunaliella* es probablemente el organismo eucariótico más halotolerante que existe, siendo el único organismo fotosintético detectado en lagos con alta concentración de sales, tales como el mar muerto en Israel, Pink Lake en Australia y en el Great Salt Lake en Utah, Estados Unidos de América (Ami Ben y Mordhay Avron, 1990).

## 2.5. Síntesis de lípidos en microalgas.

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono (12-22 C) en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies (Cohen, 1986).

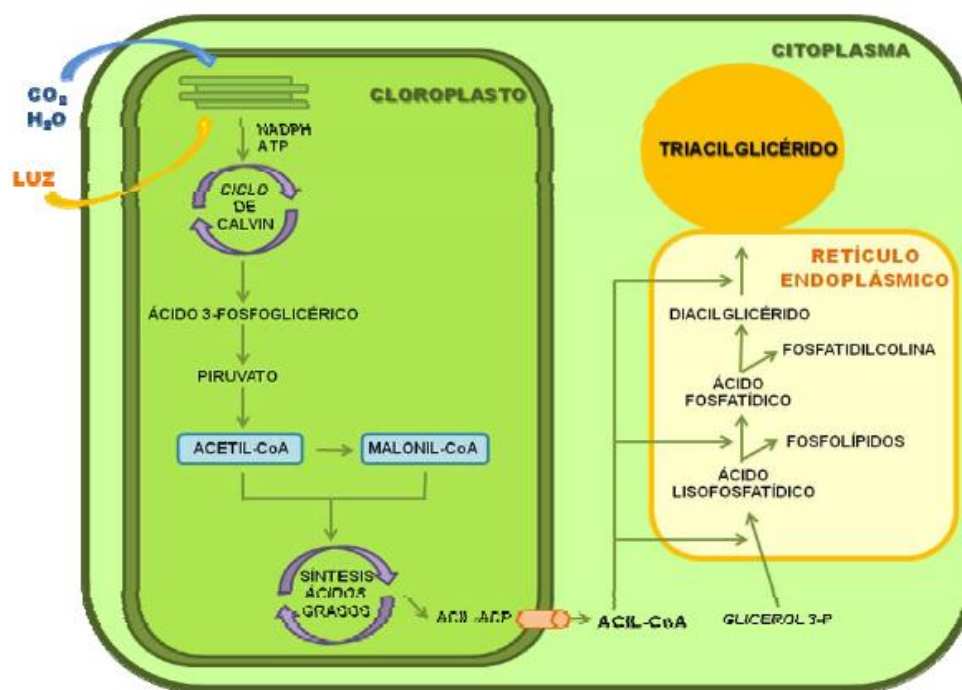
Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids) (Hu *et al.*, 2008).

Estos últimos, ocasionalmente constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. La variación del perfil de ácidos grasos entre grupos de microalgas es diversos y considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo (Cohen, 1986; Hu *et al.*, 2008; Griffiths & Harrison, 2009).

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis (Hernandez, 2009) véase figura 3 tomada de Rosenberg *et al.*, 2008.

La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y  $\beta$ -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas. Los ácidos palmíticos (16:0) y oleico (18:1 $\omega$ 9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008).

Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones uno, dos y tres del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Biosíntesis de lípidos microalgales (Tomado de Rosenberg *et al.*, 2008).

Al exponer las microalgas a estrés ambiental producido por detrimento de nitrógeno y exceso de luz se puede obtener una alta productividad de lípidos. La limitación del

nitrógeno causa tres principales cambios: disminución de la membrana tilacoidal; estimulación de hidrólisis de fosfolípidos; y activación de la enzima de síntesis de ácidos grasos (Li *et al.*, 2014).

El agotamiento de nutrientes desencadena una acumulación sustancial de TAG (triacilgliceridos), también se ha observado una marcada disminución en los contenidos de clorofila y proteína, incluida la reducción en polipéptidos ribosomales y algunas enzimas clave para la asimilación de CO<sub>2</sub> como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Msanne *et al.*, 2011).

Estos resultados sugieren que la renovación de compuestos ricos en nitrógeno como las proteínas puede proporcionar carbono para la biosíntesis de TAG en las células privadas de nutrientes. Varios genes que codifican para diacilglicerol: acil-CoA aciltransferasas, que catalizan la acilación de diacilglicerol a TAG (triacilgliceridos), muestra una mayor abundancia de transcripción bajo agotamiento de nitrógeno, pero, contra intuición, lo mismo ocurre con la expresión de genes de enzimas codificantes para la síntesis de ácidos grasos de novo, tales como la 3-cetoacil-ACP sintasa I (Msanne *et al.*, 2011).

El estrés por agotamiento de nitrógeno causa un aumento del contenido de ácidos grasos intracelulares. En general, cuando las microalgas crecen con poca intensidad de luz, el carbono asimilado se usa para la síntesis de aminoácidos y otros componentes esenciales, pero en condiciones de saturación de densidad de flujo de fotones se tiende a acumular lípidos. Una densidad de flujo fotónico adecuada contribuye a la sobreproducción de lípidos, que puede ser el resultado de la sobregeneración de compuestos fotoasimilados que se convierten en energía química (Li *et al.*, 2014).

## 2.6. Clorofila, metabolismo e importancia en condiciones de estrés.

La clorofila es un pigmento fotosintético activo de vital importancia y presente en plantas y algas. La clorofila es sintetizada en el cloroplasto. En la primera fase, el aminoácido ácido glutámico es convertido a ácido delta-aminolevulínico. A partir de

ahí, varias fases metabólicas son requeridas para la formación de los cuatro anillos que forman los tetrapirroles (Humphrey 1980).

En esta ruta metabólica, la presencia de luz es necesaria durante la reacción que produce la protoporfirina IX (Timberlake y Henry, 1986). Esta es una ruta metabólica importante debido a que, además de la clorofila, se producen también los tetrapirroles. En ambos casos la ruta es similar hasta el punto donde se sintetiza la protoporfirina IX, la cual es producida en los cloroplastos. Otras enzimas de los cloroplastos pueden luego insertar en el centro del tetrapirrol ya sea  $Mg^{2+}$  para iniciar la síntesis de clorofila, o bien  $Fe^{2+}$  para iniciar la síntesis de grupos hemo. La protoporfirina IX puede también ser exportada del cloroplasto hacia la mitocondria, donde es utilizada para producir grandes cantidades de citocromos (Timberlake y Henry, 1986).

Esta ruta biosintética es también importante porque los grupos hemo sirven de sustrato para la síntesis del fitocromo, una molécula fotosensible esencial para la fotomorfogénesis normal de la planta. Por lo tanto, los productos de los tetrapirroles están involucrados tanto en la fotosíntesis (clorofilas y citocromos en los cloroplastos), como en la respiración (citocromos en las mitocondrias) y el desarrollo de la planta (fitocromo) (Humphrey 1980). En adición a su importancia biológica, la clorofila tiene un gran potencial como producto biotecnológico ya que puede ser usado como colorante natural para alimentos (Timberlake y Henry, 1986).

La clorofila además es un indicador del tipo de metabolismo del cultivo de las microalgas (mixótrofo o autótrofo) ya que los nutrientes afectan en la síntesis de esta biomolécula. Bajo un metabolismo autotrófico, la fuente de energía es la luz solar y  $CO_2$  como fuente de carbono, mientras que un metabolismo heterótrofo usa el carbono orgánico (acetato de sodio) como fuente de carbono. El metabolismo mixótrofo además aumenta las concentraciones de clorofila, ya que se usan dos fuentes de carbono para la producción de la biomolécula (Dean *et al.* 2010).

Una baja concentración de nitrógeno en microalgas marinas provoca la reducción en la producción de clorofila (Dean *et al.* 2010) ya que este nutriente es vital para la síntesis del anillo pirrólico de la clorofila. Así, además, la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo también afecta la producción de clorofila, ya que se ha

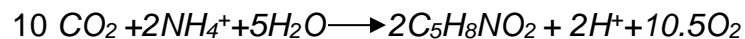
demostrado que en la fase estacionaria del cultivo la clorofila tiende a disminuir (Fidalgo *et al.* 1998).

## 2.7. Cultivo de microalgas marinas.

### 2.7.1. Presencia de CO<sub>2</sub>.

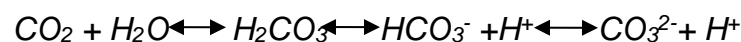
Para las microalgas fototróficas es necesario asegurar la fuente de carbono ya sea por el equilibrio natural con el CO<sub>2</sub> presente en la atmosfera, o mejorando la transferencia de masa burbujeando aire o directamente con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> o alguna fuente natural de carbono como el acetato de sodio o materia orgánica.

Según la ecuación estequiométrica de producción de biomasa para las microalgas (representadas como C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>, se puede observar que se forma 10.5 mol de O<sub>2</sub> por cada 10 mol de CO<sub>2</sub> consumidos (Muñoz, 2015).



### 2.7.2 Importancia del pH

Cuando se está cultivando una microalga, generalmente se observa un incremento del pH, pues la microalga consume rápidamente el CO<sub>2</sub> y el bicarbonato presente en la solución desplaza el equilibrio hacia la izquierda provocando un aumento en el pH por aumento en el ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y el consumo de H<sup>+</sup> (Larsdotter, 2006).



### 2.7.3. Importancia de la intensidad lumínica.

La radiación solar es el motor principal de los sistemas fotoautótrofos, pues su fuente de energía es la luz y es un factor limitante en el crecimiento de las

microalgas. Las microalgas están diseñadas para flotar y obtener la mayor cantidad de luz posible, ya que a menor profundidad la cantidad lumínica disminuye y el crecimiento es menor. Para evitar la falta de luz se debe de agitar los cultivos, esto aumenta la superficie de contacto entre las células (Muñoz, 2015).

#### 2.7.4 Mecanismos de remoción de nutrientes

El nitrógeno y el fósforo se eliminan mediante dos vías:

Vía asimilatoria:

- a) *Asimilación del nitrógeno*: El nitrógeno es un nutriente crítico para todos los organismos vivos. El nitrógeno orgánico se puede encontrar en diferentes moléculas biológicas como péptidos, enzimas, clorofila, moléculas de intercambio energético como el ADP, (adenosin difosfato) ATP (adenosin trifosfato), y material genético como el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico). El nitrógeno orgánico se deriva del nitrógeno inorgánico que se encuentra en diferentes formas incluyendo nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ). Las plantas y las algas tienen el rol primordial de transformar el nitrógeno inorgánico en nitrógeno orgánico a través de un proceso llamado asimilación (Cai *et al.*, 2013).

Algunas cianobacterias pueden convertir el nitrógeno amoniacal por un proceso que se llama fijación. El proceso de asimilación solo requiere de amonio, nitrato y nitrito. Para que estos puedan ser asimilados hasta aminoácidos requieren de más pasos en los cuales ayudarán las enzimas nitrato-reductasa, nitrito-reductasa, a su vez son necesarios de 4 a 6 electrones más para llevar a cabo este proceso, lo que indica que todas las formas de nitrógeno inorgánico deben de ser reducidas a amonio antes de ser incorporadas en la célula como aminoácidos del líquido extracelular (Muñoz, 2015).

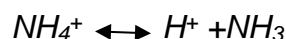
El amonio es la forma preferida de nitrógeno inorgánico para las microalgas y es justamente porque no es necesario llevar ninguna reacción redox para

su asimilación por lo que hay menor gasto energético. Varios estudios han demostrado que en general, las microalgas prefieren consumir el amonio que nitrato o nitrito y la asimilación de estos dos no se da hasta que se haya consumido totalmente el amonio (Larsdotter, 2006).

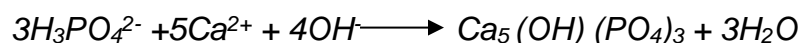
- b) *Asimilación del fósforo*: El fósforo es otro macronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas y se encuentra en ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y en la ruta del metabolismo de los carbohidratos. Las microalgas toman el fósforo como ortofosfato inorgánico insoluble (grupos  $PO_4^{3-}$  y sus formas protonadas como  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^{-}$  y  $H_3PO_4$ ). El fósforo también puede estar como fosfatos orgánicos y puede ser convertido a ortofosfatos gracias a la enzima fosfatasa que está presente en la pared celular (Fogg y Thake, 1987). La microalgas también son capaces de capturar el fósforo en exceso, que almacenan dentro de gránulos de polifosfato en caso de escases (Soto Valencia, 2012).

Vía Abiótica:

- a) *Volatilización del nitrógeno*: El nitrógeno no es solamente removido por metabolismo celular, sino también ocurre algo llamado “Stripping de amonio” donde buenas cantidades de nitrógeno amoniacal pueden ser volatilizadas cuando hay cambios abruptos en el pH en el cual ocurre un desbalance en el equilibrio del nitrógeno amoniacal y amoniaco. En los reactores de laguna abierta es el principal mecanismo de remoción de nitrógeno, así también en lagunas abiertas en regiones tropicales, la liberación de amonio es mucho mayor inclusive con pH menor a 9 (García *et al.*, 2000).



- b) *Precipitación de fósforo*: El fósforo no existe en forma gaseosa, por lo cual, hay condiciones de pH altos y altas concentraciones de oxígeno disuelto, los iones fosfatos se sedimentan en presencia de iones carbonato. (García *et al.*, 2000).





Para el óptimo crecimiento y desarrollo de las microalgas es importante cultivarlas con las concentraciones adecuadas de nutrientes. Un detrimento de nutrientes causa estrés por falta de elementos necesarios para la síntesis de proteínas, pigmentos y otros componentes esenciales para la célula, lo que ocasiona una baja en la producción de biomasa, pero también genera que se almacene y se sintetizen ácidos grasos, los cuales tienen numerosos usos industriales y alimenticios. Factores como la densidad de flujo de fotones también modifica el crecimiento de la biomasa microalgal y la producción lípidos y pigmentos, por lo que es importante conocer la relación que tienen la producción de biomasa, clorofila y lípidos en condiciones de estrés por falta de nutrientes (así como conocer que tan eficientes son las microalgas para remover nutrientes como los ortofosfatos, nitratos y nitritos, que en altas concentraciones causan eutrofización en mantos acuíferos).

# **CAPÍTULO 3**

## **Objetivos e Hipótesis**

### 3. Objetivos e Hipótesis.

#### 3.1 Objetivo general.

- Determinar el efecto en la producción de lípidos y clorofila en *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.* al ser sometidas a estrés por detrimento de la concentración de nutrientes, con dos diferentes fuentes de carbono (acetato 370 mg L<sup>-1</sup> y CO<sub>2</sub> atmosférico) y tres densidades de flujo de fotones (900 μmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 1500 μmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y 2000 μmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>).

#### 3.2 Objetivos particulares.

- Determinar cuál de las tres especies de microalgas es la que produce mayor cantidad de lípidos totales y realizar un perfil de ácidos grasos.
- Determinar el porcentaje de remoción de nutrientes (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO).

#### 3.3 Hipótesis.

La producción de lípidos y clorofila se verá afectada por la densidad de flujo de fotones, así como el tipo de fuente de carbono donde se cultiven las microalgas, además existirá una variación en la producción de lípidos dependiendo de la especie. Se espera que, en la fase estacionaria del cultivo, fase en la que ocurre el detrimento de nutrientes y el estrés del cultivo, aumente la producción de lípidos.

# **CAPÍTULO 4**

## **Metodología**

## 4. Metodología

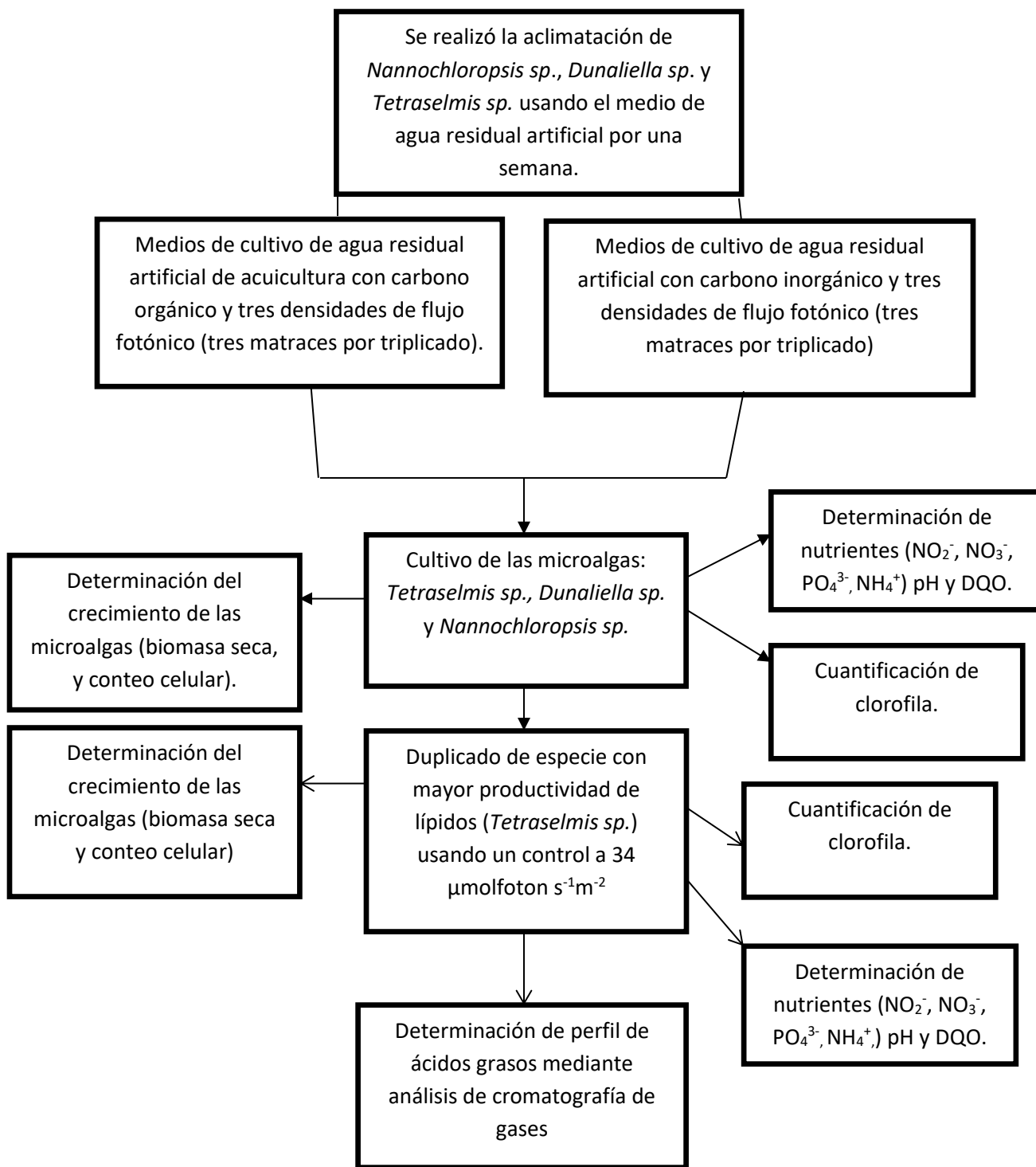
### 4.1. Estrategia de trabajo.

La estrategia inicial de trabajo (véase figura 4) fue: (A) Realizar una investigación bibliográfica a partir de búsqueda de información en artículos usando bases de datos especializadas como: Scimedirect y Scopus abarcando un rango de años de 1950-2018 usando las siguientes palabras claves: microalgas, biodiesel, nutraceuticos, biorremediación de aguas residuales, producción de clorofila y biotecnología de microalgas y se emplearon libros para obtener conceptos y técnicas como APHA (1998), y Arredondo *et al.* (2017). (B) Posteriormente a partir de la anterior revisión se seleccionó y se montaron diferentes técnicas para cubrir los objetivos de este estudio. Dado que este estudio son bioensayos se procuró estandarizar las condiciones experimentales:

- 1- Se seleccionaron tres especies de microalgas marinas: *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* ya que estas, basándonos en la literatura (Boussiba *et al.*, 1987 y Teo *et al.*, 2014) son las especies que tienen mayores rendimientos de productividad de ácidos grasos. Las cepas fueron proporcionadas por el cepario de microalgas marinas de la unidad académica Yucatán de la UNAM ubicada en Sisal, Yucatán, México.
- 2- Se optó por usar un diseño experimental de dos factores con tres niveles (De la Vara, 2015) usando tres matraces de dos litros por cada experimento. Se empleó un control con CO<sub>2</sub> atmosférico como fuente de carbono inorgánico y se comparó con acetato de sodio y CO<sub>2</sub> atmosférico como fuente de carbono orgánico y todo esto fue bajo diferentes intensidades de densidad de flujo de fotones medidas en campo (900, 1500 y 2000  $\mu\text{mol foton s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).
- 3- El agua residual sintética (ARS) empleada en los experimentos se elaboró, tomando como base, la caracterización realizada al agua residual real (ARR)

procedente del cultivo de especies marinas de interés comercial, como son pulpo, camarón, robalo, corvina, pargo y especies ornamentales, que se realiza en las instalaciones de la Unidad Académica Yucatán de la UNAM, ubicada en Sisal, Yucatán, México. Los valores obtenidos para el ARR fueron las siguientes: 45 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, 10 mg L<sup>-1</sup> de nitratos, 30 mg L<sup>-1</sup> de amonio, 17 mg L<sup>-1</sup> de ortofosfatos y 270 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO). El ARS se preparó empleando sal de mar Instant Ocean adicionada en agua destilada, hasta alcanzar la salinidad deseada (31 UPS para *Nannochloropsis sp.* y *Tetraselmis sp.* y 41 UPS para *Dunaliella sp.* (debido a que esas son las salinidades a las cuales se alcanza el crecimiento óptimo de cada especie). Para alcanzar las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono, se adicionó KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y acetato de sodio en las cantidades necesarias para lograr valores cercanos a los del ARR (15.645 mg L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 7.5 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, 73.375 mg L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 110.116 mg L<sup>-1</sup> [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y acetato de sodio 370 mg L<sup>-1</sup>).

- 4- Las metodologías para las determinaciones de biomasa (Arredondo et al., 2017), NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (APHA, 1998, Grasshoff *et al.*, 1999, Schnetger y Lehnert, 2014 y Vyrides y Stuckey, 2009.) lípidos (Blingh y Dyer *et al.*, 1959) y clorofila (APHA, 1998) fueron estandarizadas. Todas las determinaciones se realizaron tres veces por semana.
- 5- Se realizó un segundo experimento al cultivo de *Tetraselmis sp.* ya que esta especie obtuvo la mayor producción y productividad de lípidos. Posteriormente se realizó un perfil de ácidos grasos usando un cromatógrafo gases masas GCD G1800B Hewlett Packard (Arredondo *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Estrategia de trabajo.

#### 4.2. Selección de especies de algas para experimentar.

Para el proyecto se seleccionaron tres diferentes especies de microalgas marinas: *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.* Estas especies se seleccionaron en función de una investigación bibliográfica previa a la realización del proyecto (Boussiba *et al.*, 1987; Chini Zittelli *et al* 1999; Hu y Gao 2006).

#### 4.3. Cultivo de las especies de algas seleccionadas.

Para realizar los cultivos de las microalgas de interés primero se cultivaron en un medio de mantenimiento. En este caso fue 1.0 g L<sup>-1</sup> de fertilizante marca Peters 20-20-20 (nitrato, amonio y fosfato) con aireación constante. La salinidad usada en los medios de cultivo fue de 31 UPS (unidades prácticas de salinidad medidas con un hidrómetro InstantOcean) para los cultivos de *Tetraselmis sp.* y *Nannochloropsis sp.*, mientras que para los cultivos de *Dunaliella sp.* se usaron 41 UPS por ser una microalga halotolerante que crece mejor en altas concentraciones de NaCl (<http://nies.go.jp/>). Para la aireación constante en los matraces con medio de cultivo se usaron bombas de aire Elite P-799.

Después se realizó la aclimatación de *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.* usando el medio de agua residual artificial por una semana (Sacristán *et al.*, 2014). Posteriormente se centrifugaron los medios de cultivo a 4500 G por 15 minutos rpm usando una centrifuga Thermo Scientific Sorvall ST 16 para obtener el inóculo concentrado de 1x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> de cada especie, para después sembrar el inóculo concentrado (100 mL de cada especie) en un matraz de 2 L con 1.3 L agua destilada más nutrientes correspondientes a aguas residuales provenientes del cultivo de camarón. El cultivo en agua residual artificial de microalgas se realizó para cada especie por triplicado (tres matraces por cada determinación) por cada concentración de luz (900, 1500 y 2000  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) y con diferente fuente de carbono, acetato de sodio (270 mg L<sup>-1</sup>) y CO<sub>2</sub> para carbón orgánico y un grupo control usando CO<sub>2</sub> como fuente de carbón inorgánico para cada densidad de flujo de fotones. Se usó un fotoperiodo de 12 horas de luz proporcionada por lámparas fluorescentes 27W Grow LED PAR38 lightbulbs; y 12

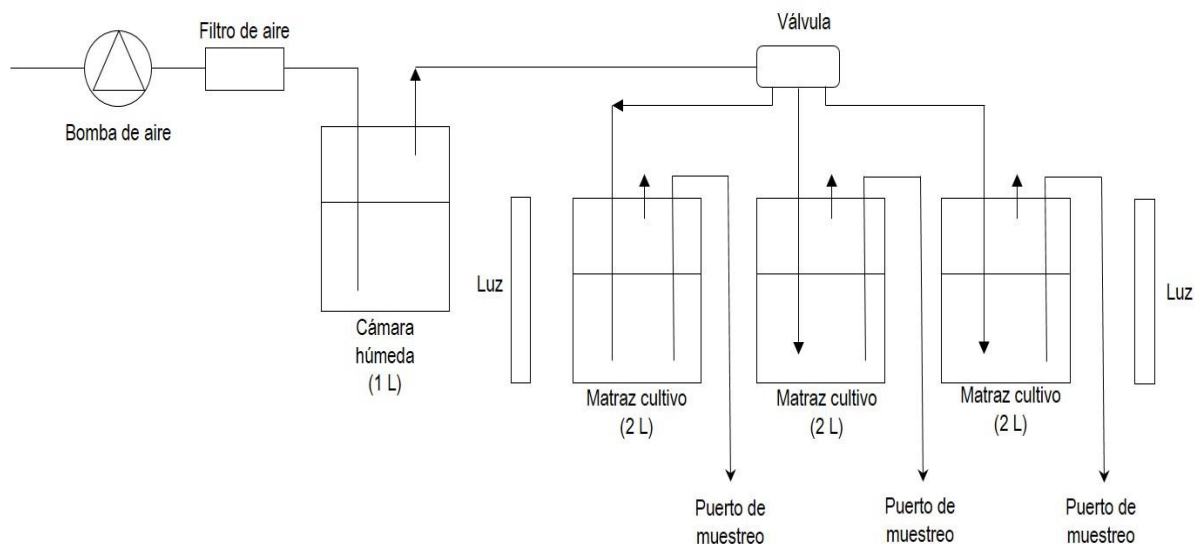


horas de oscuridad (<http://mcc.nies.go.jp/>). La densidad de flujo de fotones fue de 900, 1500 y 2000  $\mu\text{mol foton s}^{-1}\text{m}^2$  medido con un fotoradiómetro Delta Ohm HD 2302.0

Los medios de cultivo para carbono orgánico se les adicionaron 370  $\text{mg L}^{-1}$  de acetato de sodio. A los medios de cultivos con carbono inorgánico se les suministró  $\text{CO}_2$  mediante un sistema de suministro de aire constantemente reciclado.

Para generar estrés en el medio se dejó sin suministro de nutrientes en la fase estacionaria del crecimiento de las microalgas (Teo *et al.*, 2014). Este paso duró aproximadamente una semana o dos semanas dependiendo de la duración de la fase estacionaria de cada especie.

Cada cultivo se realizó por triplicado con las tres diferentes intensidades de luz (900, 1500 y 2000  $\mu\text{mol foton s}^{-1}\text{m}^2$ ) como se describe en la figura 5 sacada de Gonzáles Palma. Mediciones como pH y temperatura de los medios de cultivo se realizaron tres veces a la semana con respecto a la duración del cultivo. Para el segundo experimento con *Tetraselmis sp.* se usó la formulación del agua residual artificial con acetato de sodio y se usaron cuatro concentraciones de luz diferentes: 900, 1500, 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y para el grupo control 34  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , según lo recomendado en la base de datos Nies ([www.nies-shingen.ac.jp](http://www.nies-shingen.ac.jp)). Se tomaron las imágenes en el laboratorio usando un microscopio L3201 LED epifluorescence con una cámara Canon Dsrl HD, usando el objetivo x100 más zoom de x10.



**Figura 5.** Modelo de cultivo (González-Palma, datos sin publicar)

La toma de muestra se realizó tomando un volumen del medio de cultivo de 17 mL con una jeringa esteril de 20 mL directamente del puerto de muestreo para la posterior filtración de 10 mL de muestra usando un filtro millipore de celulosa de abertura de poro de 0.47  $\mu\text{m}$ . No se filtraron los volúmenes de muestra destinados a la determinación de lípidos (2 mL) y clorofila (5 mL), Posteriormente los 10 mL se fraccionaron en diferentes volúmenes según lo establecido en la metodología de las determinaciones de nutrientes y materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno. Es importante mencionar que en el muestreo es prioritario evitar cualquier fuente de contaminación que pudiera afectar los medios de cultivo de microalgas, por lo que se debe de realizar esto en una cámara de cultivo microbiológica, en un ambiente libre de flujo de aire cruzado, con total asepsia y siempre usando material estéril.

*4.4. Determinación de nutrientes.*

La determinación de concentración de nutrientes da información acerca de la calidad del agua y que cantidad de nutrientes fueron consumidos por las microalgas. Estas determinaciones se realizaron por triplicado tres veces a la semana. Para las lecturas espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000.

Para la obtención de los nutrientes consumidos se realizó la determinación de ortofosfatos, nitritos, nitratos, amonio y materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO). También se analizó la producción de lípidos totales.

Para la determinación de fosfatos se usó un método colorimétrico usando el reactivo mixto que consiste en una mezcla de ácido sulfúrico, molibdato de amonio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ , ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio  $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6]$ . A 2 mL de muestra se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de reactivo mixto. Se

dejó reaccionar 30 min y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 680 nm (Grasshoff *et al.*, 1999).

La cantidad de nitratos se determinó utilizando 45  $\mu\text{L}$  de muestra a la que se añaden 1000  $\mu\text{L}$  de reactivo  $\text{NO}_x$ . Para preparar el reactivo  $\text{NO}_x$  se usaron 200 mL de  $\text{HCl}$  0.5 N. Posteriormente se pesaron 0.5 g de  $\text{VCl}_3$  y se añadieron a la disolución de  $\text{HCl}$ . Se añadió 0.2 g de sulfanilamida y disolvió. Se adicionan 0.01 g de NED, se incubó durante una hora y después se realizó lectura de absorbancia a 540 nm (Schnetger y Lehnert, 2014).

Para nitritos se usó 1 mL de muestra con 100  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida, incubados por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de NED. La solución de sulfanilamida y NED forma un complejo fácilmente cuantificable mediante espectrofotometría (Grasshoff *et al.*, 1999).

La materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno se determinó usando un análisis colorimétrico. Para evitar la interferencia de los cloruros se usó una relación 20:1  $\text{HgSO}_4$ :  $\text{Cl}^-$  antes de la digestión, esto equivale a agregar 0.73 g de  $\text{HgSO}_4$  a una muestra de 3 mL con una concentración de 20  $\text{g L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ . Una vez precipitado el cloro se toman los 2.5 mL de muestra y se adicionaron los demás reactivos :1.2 mL de disolución de digestión ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 33.3 g de  $\text{HgSO}_4$ ) y 2.8 mL de ácido sulfúrico. Se mide a 600 nm utilizando un blanco sin digerir como referencia midiendo a longitudes de onda de 420 nm y 600 nm (Vyrides y Stuckey, 2009).

Para la determinación de nitrógeno amoniacal se tomaron 2 mL de muestra se añadió 1 mL del reactivo oxidante (hipoclorito de sodio), se agitó y se dejó reaccionar por lo menos durante 1.5 h a 32° C. Posteriormente se adicionaron 0.1 mL de arsenito de sodio y se agitó. Se añadió 1.07 mL de sulfanilamida. Después de 2 a 8 minutos se añadió 0.1 mL de NED. El color se desarrolla completamente después de 10 min y es estable por 2 h. La lectura se realizó a una longitud de onda de 540 nm (Grasshoff *et al.*, 1999).

#### 4.5. Determinación de lípidos.

Para la determinación de lípidos se usó el método colorimétrico de fosfovainillina usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se tomaron 2 mL de muestra de cultivo de microalga sin filtrar. Se calentó a 100°C por 10 minutos y enfrió en baño de hielo por 5 minutos. Después se adicionó fosfovainillina para posteriormente incubar en un equipo Ecoshel mod 9025e a 37 °C a 4 G por 15 minutos. Se leyó su absorbancia a 530 nm (Bligh y Dyer *et al.*, 1959, Cottet, 1965). Se realizó por triplicado tres veces por semana.

#### 4.6. Determinación de clorofila.

La determinación de cantidad de clorofila en una muestra de cultivo húmeda se realizó mediante un método espectrofotométrico y por extracción de disolventes usando una mezcla 90% de acetona y 10% de solución acuosa de MgCO<sub>3</sub>. Primero se procedió a tomar una muestra de 5 mL de medio de cultivo y se le adicionó 5 mL de la mezcla de disolventes. Se dejó reposar 24 horas a 4 C° en ausencia de luz. Mediante centrifugación (Thermo Scientific Sorvall ST 16) a 825 G por 20 minutos se obtuvo el clarificado.

Posteriormente se leyó la absorbancia del clarificado con un espectrofotómetro Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000 a 665 nm y 750 nm antes de acidificar y después de acidificar con HCl 0.1 N, porque la clorofila “a” puede ser sobreestimada incluyendo a los feopigmentos que absorben cerca de la misma longitud de onda que la clorofila “a”. Al acidificarse, la clorofila “a” pierde el átomo de magnesio, convirtiéndose en feofitina “a”. La feofitina pura no produce la reacción al acidificar y la relación es Abs 664/665=1.0 significando que todo es feofitina en estado fisiológico. La mezcla de clorofila “a” y feofitina “a” tienen un rango que va entre 1.0 y 1.7 (APHA, 1998). Posteriormente se realizará el cálculo pertinente para conocer la concentración de clorofila “a” en la muestra (APHA, 1998):

$$\text{Clorofila "a" (mg/m}^3\text{)} = \frac{26.7(664-665)V1}{(V2)(L)}$$

Donde:

26.7= Corrección de absorbancia

664 y 665= Abs corregidas (664-750 y 665<sub>acidificada</sub>-750<sub>acidificada</sub>)

V1= Volumen de extracto en L

V2=Volumen de la muestra en m<sup>3</sup>

L= recorrido de luz de la cubeta en cm

Determinar la concentración de la clorofila “a” es de importancia para conocer el tipo de metabolismo que tiene la microalga bajo ciertas condiciones y como el metabolismo puede afectar la producción de lípidos, así como también porque es un metabolito secundario muy usado en la industria.

Esta determinación se realizó por triplicado tres veces a la semana para observar el desarrollo del cultivo.

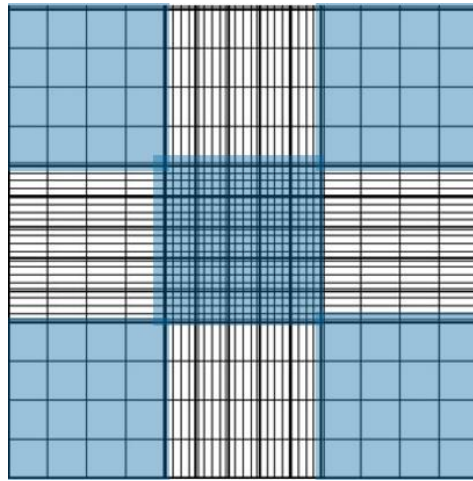
#### *4.7. Determinación de producción de biomasa microalgal.*

Se tomaron 10 mL de muestra del medio de cultivo y posterior filtración con una membrana millipore de 0.47  $\mu\text{m}$  de abertura de poro. Se secó en estufa a 60 °C por una hora. (APHA, 1998). Cada análisis de peso seco se realizó cada dos días hasta la muerte del cultivo.

Complementario al peso seco se realizó el conteo celular se llevó a cabo por medio de una cámara de Neubauer (Marienfeld) al tomar muestras de 100  $\mu\text{L}$  de cultivo y diluirlo en un volumen final de 1 mL con de 890  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 10  $\mu\text{L}$  de HCl 5 % para inmovilizar a las células. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de esta dilución, se depositaron sobre una de las cuadrículas de la cámara de Neubauer véase figura 6 y se dejó caer su respectivo cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Se procedió a contar el número de células en 5 cuadrantes de 1 x 1 mm de acuerdo con el protocolo de conteo en Bastidas (2012); por convención, si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, entonces, deben contabilizarse. Por el contrario, si tocan los límites inferior o derecho, entonces, no deben contarse (véase figura 6 de Bastidas, 2012). Posteriormente, se tomó el

promedio de los 5 cuadrantes, se multiplicó por el factor de la dilución (F.d.) y por el volumen de agua formado en el cuadrante de la cámara de Neubauer, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración células/mL} = (X \text{ células})(10,000 \text{ mL}^{-1})(\text{Factor de dilución})$$



**Figura 6.** Cuadrantes de la cámara de Neubauer (Bastidas, 2012).

También se calcularon parámetros poblacionales tales como la velocidad específica de crecimiento, también conocida como tasa de crecimiento y puede ser descrita por la ecuación de Guillard (Guillard, 1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

En donde:

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )

X = concentración celular ( $cel \text{ mL}^{-1}$ ) en dos tiempos de la fase exponencial y/o logarítmica de crecimiento.

Ln = logaritmo natural

T = tiempo en días.

El tiempo de duplicación ( $T_d$ ), es el tiempo necesario para que se duplique la

población (Arredondo *et al.*, 2017). Cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En donde:

$T_d$  = tiempo de duplicación (d).

$\ln 2$  = 0.6931.

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )

La sumatoria de  $\mu$  ( $\Sigma\mu$ ) permite observar de una manera más clara las etapas de crecimiento y desarrollo de un cultivo de microalgas (Arredondo *et al.*, 2017)

#### 4.8. Extracción de lípidos contenidos en la biomasa de las microalgas.

Para la extracción se concentró la biomasa de los medios de cultivo de agua residual artificial después de terminar el último muestreo. Esto se realizó mediante centrifugación de 25 mL de muestra a 1860 G por 5 minutos en una centrifuga Thermo Scientific Sorvall ST 16. Posteriormente se decantó y se le adicionaron 5 mL de 2-EE (2-Etoxietanol) calentando constantemente a 60 °C por 30 minutos. Se usaron filtros de fibra de vidrio de abertura de poro de 0.47  $\mu$ m marca Millipore y se enjuagó con una mezcla de MeOH:Acetona 1:1 y colocó en un matraz de bola previamente pesado. La muestra se llevó a sequedad mediante un rotaevaporador BÜCHI R-300 a 60 °C. Se resuspendió el extracto en 2:4 mL de 2:2:1:1 (hexano: tolueno, acetona: metanol) (Jones *et al.*, 2012).

El cálculo de cantidad de lípidos totales se realizó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & (\text{Matraz de bola con extracto}) - (\text{Matraz de bola vacío}) \\ & = g \text{ totales de lípidos extraídos} \end{aligned}$$

$$\frac{g \text{ totales de lípidos extraídos}}{\text{Volumen (mL)}} = \text{concentración } \left(\frac{g}{L}\right)$$

Para el cálculo del porcentaje de lípidos extraídos de biomasa se usa la siguiente ecuación:

$$\left( \frac{\text{Total de lípidos } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Biomasa húmeda} \left(\frac{g}{L}\right)} \right) \times 100 = \text{porcentaje lípidos extraídos de la biomasa}$$

#### 4.9. Perfil de ácidos grasos.

El perfil de ácidos grasos se realizó en el Laboratorio de lípidos de microalgas marinas en el Centro de Investigaciones del Noreste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur. Se usó GC-MS (cromatografía de gases acoplado a masas) usando detector FIT (flama ionizante).

##### 4.9.1. Proceso de derivatización.

El extracto de lípidos se evaporó con N<sub>2</sub> gaseoso a sequedad y se derivatizó con una mezcla 5:95 de ácido clorhídrico: metanol a 85°C por 2.5 horas (Sato y Murata, 1988). Después de enfriado se agregaron 1.5 mL de hexano. Se agitó suavemente el tubo, para mezclar y se colecta la capa superior de hexano después de 1 minuto o hasta que se separen claramente las dos fases, se agregaron otros 1.5 mL y se colectaron en el mismo tubo. El hexano se evaporó a sequedad con N<sub>2</sub> gaseoso y se resuspendió en el volumen de hexano calculado para que la concentración estuviera en el intervalo de concentraciones de la curva de calibración. En este caso la concentración de lípidos fue más alta y sobrepasó el intervalo lineal de la curva por lo que se diluyó 1:101, agregando 10 µL de la muestra y 1000 µL de hexano (Arredondo *et al.*, 2017).



#### 4.9.2 Método de análisis cromatográfico.

Las muestras derivatizadas se inyectaron en un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas GCD G1800B Hewlett Packard con las condiciones que se muestran en la Tabla 2 y 3:

**Tabla 2.** Condiciones del método cromatográfico

<b>Condiciones para análisis cromatográfico</b>	
<b>Columna:</b>	Omegawax 250 (Supelco, Bellefonte, PA)
<b>Volumen de inyección:</b>	3 µL
<b>Gas portador:</b>	He alta pureza
<b>Flujo del gas portador en la columna:</b>	0.9 mL/min
<b>Inyección de la muestra:</b>	sin división (splitless)
<b>Temperatura del inyector:</b>	250 °C
<b>Temperatura del detector:</b>	260 °C
<b>Temperatura inicial del horno:</b>	110 °C/ 3 min
<b>Incremento:</b>	de 30 °C/min hasta 165 °C

Se mantuvo esa temperatura por 2 min y posteriormente se incrementó en 2.2 °C/min hasta 209 °C. Se mantuvo en esa temperatura por 28 min.

**Tabla 3.** Método para espectros de masas.

<b>Método de adquisición de espectros de masas:</b>	
<b>Retardo del solvente:</b>	3.3 min
<b>Rango masas:</b>	45-450 uma
<b>Tiempo entre barridos:</b>	0.5 min

#### 4.9.3 Identificación de ácidos grasos.

Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la base de datos de espectros de masas NIST 2000.

Esta identificación se confirma por:

1. Interpretación de los espectros de masas de metil-ésteres de ácidos grasos.
2. Comparación de los tiempos de retención de los picos en la muestra, con los tiempos de retención de un patrón comercial de 37 metil-ésteres de ácidos grasos (Supelco 47855-U) (McLaferty y Turecek, 1993, Carreón-Palau *et al.*, 2007, Del Angel-Rodríguez *et al.*, 2014).

#### 4.9.4 Cuantificación de ácidos grasos.

Para calcular la concentración de los ácidos grasos presentes en las muestras, se integró el área bajo los picos, y se interpoló con una curva de calibración que relaciona cinco concentraciones conocidas (5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de cada uno de los 37 estándares de ácidos grasos metil esterificados, con sus respectivas áreas bajo el pico, siendo el área directamente proporcional a la masa en el sistema GC-MS

Para calcular la concentración de cada ácido graso por miligramos de muestra se usa la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\left[\left(\frac{A}{FC}\right) \cdot VR\right]}{P}$$

En donde:

C= Concentración ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )

A = Área bajo el pico de cada ácido graso

FC= Factor de corrección o pendiente de la curva de cada ácido graso

Vr = Volumen de hexano (mL) / Volume de inyección ( $\mu\text{L}$ )

P = Peso de la muestra (mg)

Para el cálculo del porcentaje se considera la suma de los  $\mu\text{g mg}^{-1}$  como el 100 % con una regla de tres se calcula el porcentaje de cada ácido graso (Arredondo *et al.*, 2017).

#### *4.10 Diseño experimental.*

El objetivo principal planteado en el proyecto es conocer el efecto que tiene el detrimento de nutrientes y la intensidad luminosa con respecto a la producción de lípidos y la producción de clorofila.

Con el objetivo de conocer si existen diferencias en la producción de lípidos y clorofila con respecto a las diferentes condiciones de cultivo (densidad de flujo de fotones, fuente de carbono y estrés por detrimento de nutrientes), se realizó un análisis de varianza ANOVA con dos factores que es la densidad de flujo de fotones y fuente de carbono y tres niveles que son  $900 \mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $1500 \mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $2000 \mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Además, se realizó la prueba Tukey en aquellos cultivos donde se rechazó la hipótesis nula (valor  $P=0.05$ ) y así determinar que cultivos y a qué condiciones presentaron diferencias estadísticamente significativas (De la Vara, 2015).

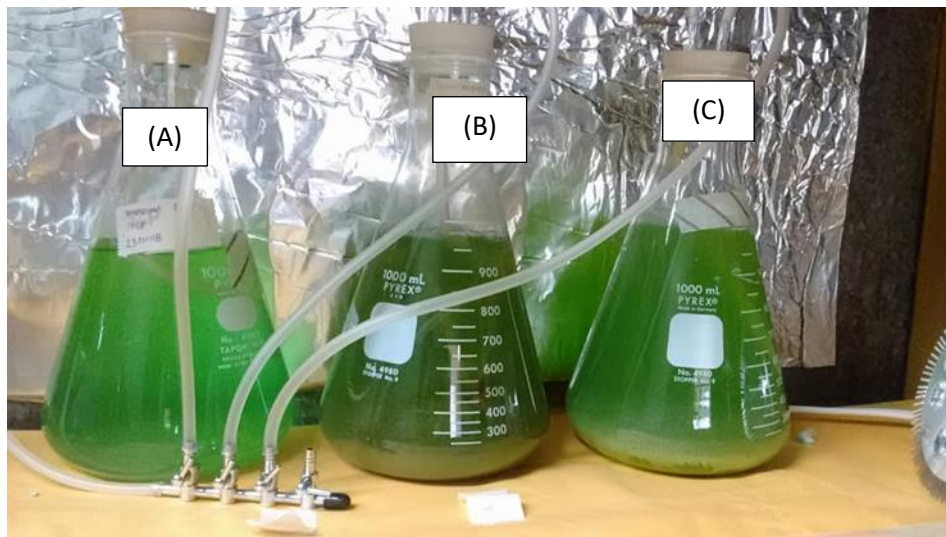
# **CAPÍTULO 5**

## **Resultados y Discusión**

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Cultivo de las microalgas

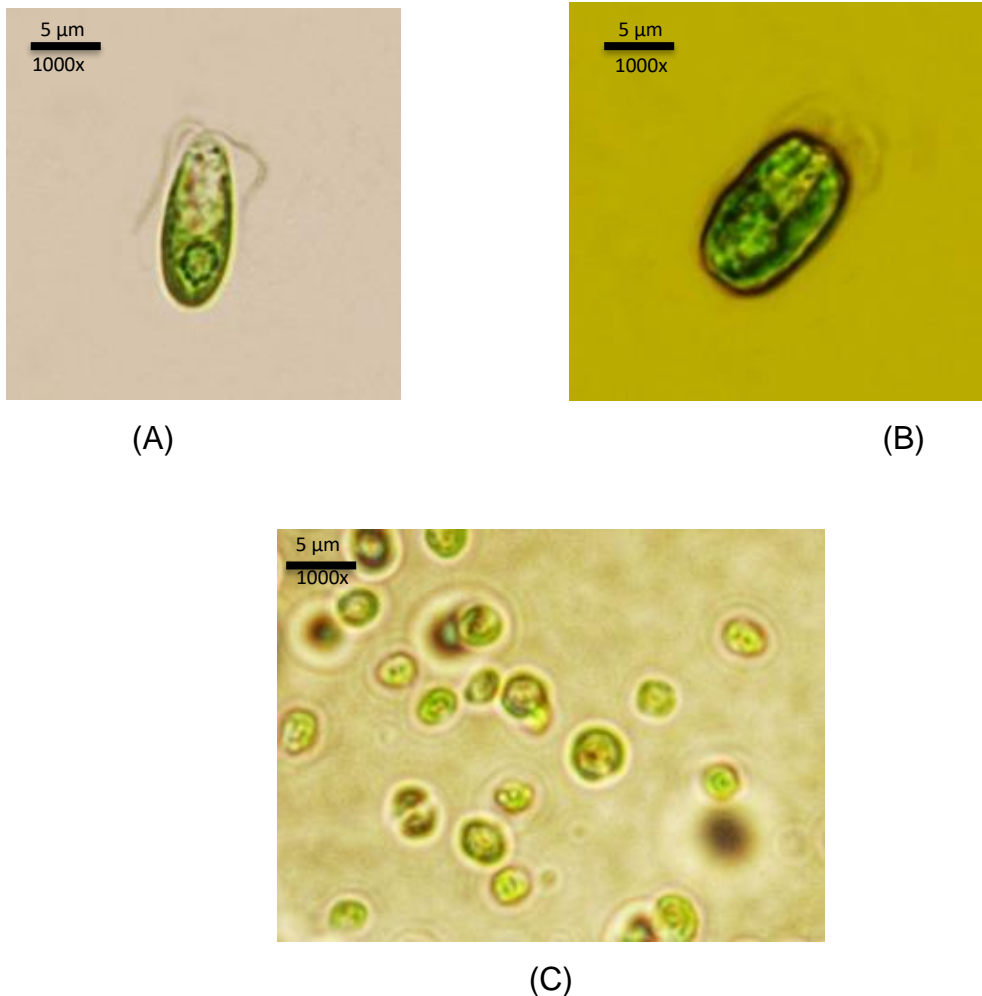
Después de una semana de aclimatación de las tres especies *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Tetraselmis sp.* en el medio de agua residual artificial, se logró la concentración esperada de  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 7). Posteriormente se tomó una muestra de 100 mL del pellet de centrifugado a 4500 G y se agregó a matraces Erlenmeyer de 2 L con 1.2 L de medio de cultivo de agua residual artificial.



**Figura 7.** Cultivos (A) *Tetraselmis sp.*, (B) *Nannochloropsis sp.* y (C) *Dunaliella sp.* en cámara de cultivo del laboratorio de microbiología experimental.

5.1.1. Cultivo de *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

El medio utilizado para las tres especies de microalgas marinas fue el medio artificial de agua residual de acuicultura de granjas de camarón: 15.645 mg L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 7.5 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, 73.375 mg L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 110.116 mg L<sup>-1</sup> [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 370 mg L<sup>-1</sup> de acetato de sodio (el acetato de sodio solo se añadió en los cultivos con fuente de carbono orgánico). Se usó un periodo de luz-oscuridad de 12h:12h. La morfología de las tres especies se presenta en la figura 8.



**Figura 8.** Células (A) *Dunaliella sp.*, (B) *Tetraselmis sp.* y (C) *Nannochloropsis sp.* Microfotografía tomada con L3201 LED epifluorescence Canon Dsrl HD x100 x10 realizadas por la alumna de servicio social Citlalli Mendoza Reza.

El tamaño promedio celular de *Tetraselmis sp.* al observarse en microscopio fue de 13  $\mu\text{m}$ , similar a los 2.5-25  $\mu\text{m}$  lo reportado por Guiry (2018) y Mohd *et.al.* (2014). Bajo el microscopio, *Tetraselmis sp.* véase figura 8(B) aparece como una microalga unicelular, cuadriflagelada, (Turmenl *et al.*, 2016; Jiang Junpeng *et al.*, 2017) con forma ovalada, aunque, puede variar a circular, elíptica, comprimida o una combinación de estas formas, en las que sus longitudes laterales pueden variar en el rango de 3.5-25  $\mu\text{m}$ . Presenta cuatro flagelos de igual longitud, los cuales están situados cerca del ápice. Los flagelos emergen en pares (Guiry, 2018).

Tiene un sólo cloroplasto de gran tamaño, un pirenoide que está rodeado por una cáscara de almidón y estigma. El estigma se compone de dos capas de lípidos y gránulos separadas por un solo tilacoide, que son paralelas a la membrana del cloroplasto (Reyimu y Ozcimen, 2017). El núcleo de la célula se encuentra entre los lóbulos anteriores del cloroplasto en paralelo con el pirenoide (Guiry, 2018).

*Dunaliella sp.* véase figura 8(A) es una microalga unicelular biflagelada, ovoide, oval o piriforme. Es capaz de cambiar su forma celular y volumen en respuesta a cambios en la osmolaridad y otras condiciones de crecimiento; debido a que tiene una delgada membrana plasmática (Preetha *et al.*, 2012).

El cloroplasto es generalmente liso, pero a veces puede ser granular, debido a la acumulación de granos de almidón en el estroma. El estigma es difuso y de forma irregular. El tamaño de *Dunaliella sp.* promedio fue de 12  $\mu\text{m}$ , similar a lo reportado en <http://nies.go.jp/> donde el rango de tamaño es de 12-15  $\mu\text{m}$ . siendo visible sus dos flagelos característicos.

*Nannochloropsis sp.* véase figura 8(C) fue de 3.5  $\mu\text{m}$  siendo como referente lo reportado por Fawley, (2015), de 4.0 a 5.1  $\mu\text{m}$ , siendo de forma esférica y la más pequeña de las tres especies, es posible ver su estigma.

#### 5.1.1.1. Potencial de hidrogeno (pH) y temperatura para *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

Para el cultivo de *Tetraselmis sp.* se evaluó la temperatura tres veces al día durante la duración del cultivo (12 días) promediando 25.37  $^{\circ}\text{C} \pm 2.60$   $^{\circ}\text{C}$ . El pH inicial de las

muestras con carbón orgánico véase figura 9(A) fue: C.O.900=7.44±0.05, C.O.1500=7.49±0.02 y C.O.2000=7.50±0.01. Para los controles con carbón inorgánico el valor inicial fueron los siguientes: C.I.900= 7.32±0.49, C.I.1500= 7.40±0.23 y C.I.2000= 7.37±0.65. El valor de potencial de hidrógeno inicial es similar al reportado por Silva *et al.*, (2011) de 7.1. En el control como en las muestras, el pH comenzó a aumentar llegando a su punto máximo entre el día ocho y diez de cultivo. El cultivo de carbono inorgánico a 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  es el que tuvo el mayor valor de pH (8.49±0.54) siendo el valor más alto reportado por Silva *et al.*, (2011) de 8.7. Posterior a esto se observa una caída del pH, esto puede ocurrir por que se llegó a la fase estacionaria de crecimiento y la actividad fotosintética disminuye y el pH ya no continúa elevándose (Sacristán *et al.*, 2013). Tanto el grupo control como en las muestras se observa este comportamiento.

Para el cultivo de *Dunaliella sp* se evaluó la temperatura tres veces al día durante la duración del cultivo (18 días) promediando 24.71 C° ± 3.93 C°.

El pH también se midió una vez al día durante 18 días véase figura 9 (B). El pH inicial de las muestras con carbón orgánico fue: C.O.900=7.29±0.03, C.O.1500=7.30±0.03 y C.O.2000=7.28±0.01. Para los cultivos con carbón inorgánico el valor inicial fueron los siguientes: C.I.900= 7.4±0.71, C.I.1500= 7.36±0.12 y C.I.2000= 7.47±0.43. El pH aumentó el día cuatro, correspondiente a la fase logarítmica del cultivo y ocurre remoción del CO<sub>2</sub> en el medio, por lo que el pH disminuyó (Muñoz y Guieysse, 2006). El valor de todos los cultivos se mantiene dentro del rango de 7.5 a 9.7 que es el límite óptimo del crecimiento de *Dunaliella sp.* (Olivarría. 2010).

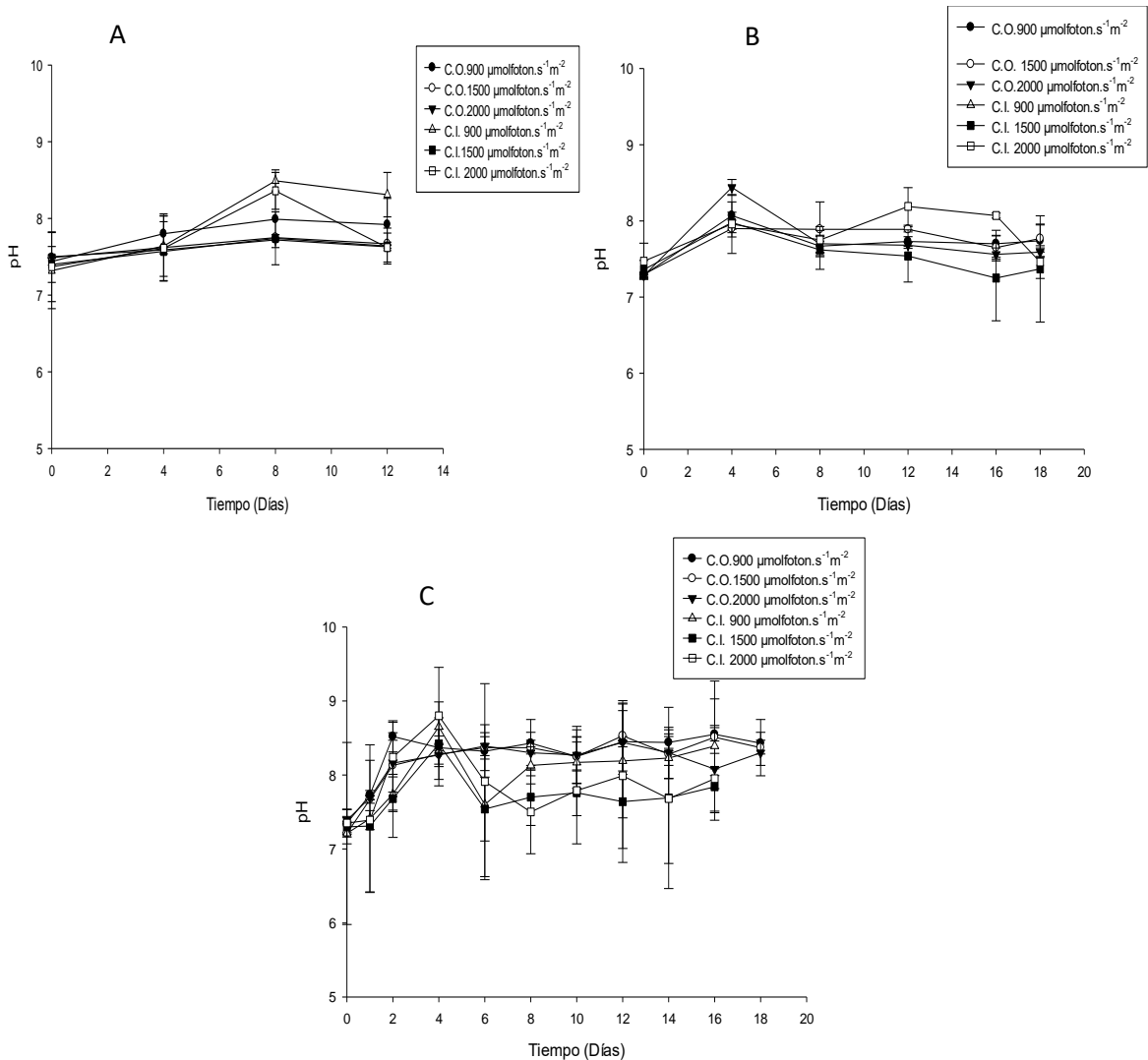
Para el cultivo de *Nannochloropsis sp* se evaluó la temperatura tres veces al día durante (22 días) promediando 22.15 C° ± 3.49 C°.

El pH también se midió una vez al día durante 22 días véase figura 9 (C). El pH inicial de las muestras con carbón orgánico fue: C.O.900=7.35±0.02, C.O.1500=7.22±0.01 y C.O.2000=7.39±0.05. Para los controles con carbón inorgánico el valor inicial fueron los siguientes: C.I.900=7.21±0.23, C.I.1500=7.3±0.21 y C.I.2000=7.35±0.18. El pH en la muestra con carbono orgánico presenta un incremento inicial y una tendencia a conservar un pH alrededor de 8,



pH reportado por Macías *et al.*, (2017) es el óptimo para el crecimiento de *Nannochloropsis sp.* lo que indica que la actividad fotosintética no disminuye y se mantiene por 12 días.

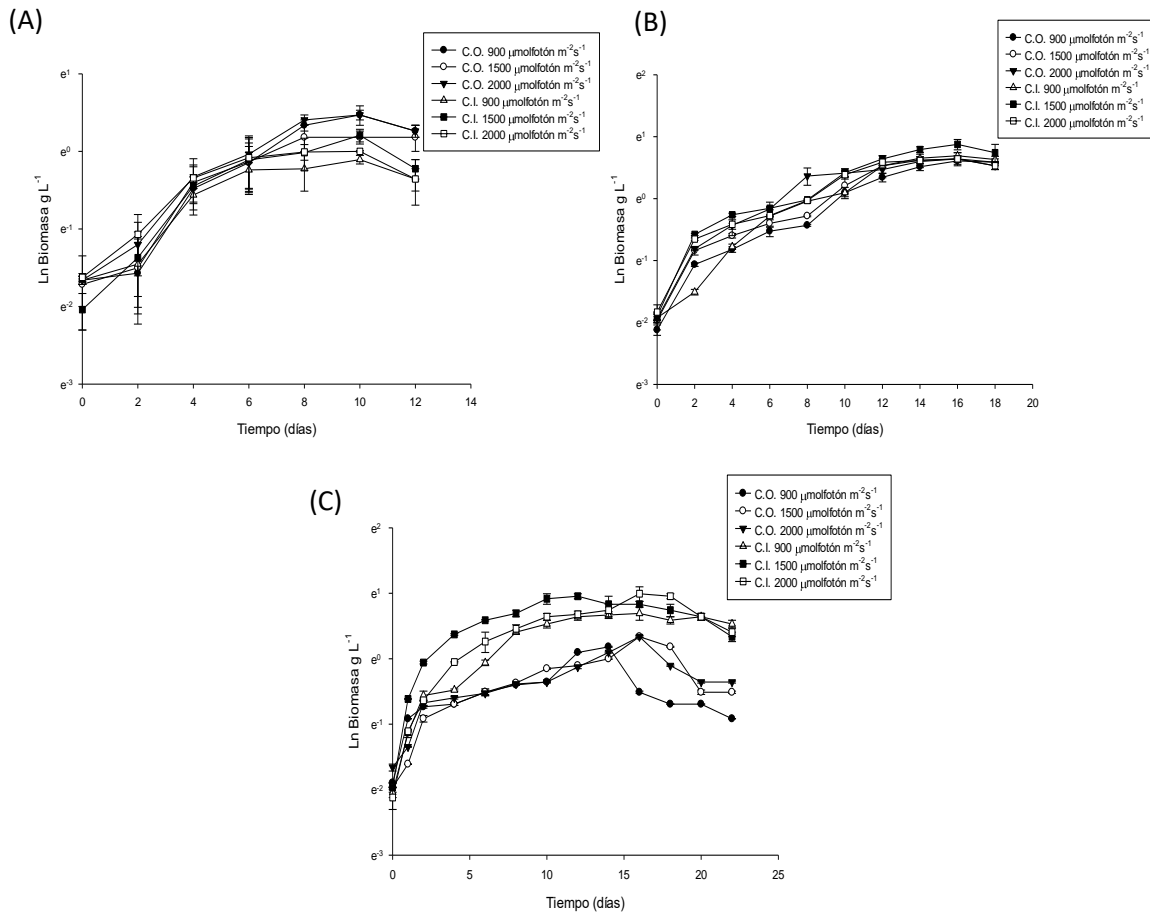
El comportamiento del pH durante el cultivo se muestra en la figura 9:



**Figura 9.** Variación del pH en los cultivos con de (A) *Tetraselmis sp.*, (B) *Dunaliella sp.* y (C) *Nannochloropsis sp.* con carbón orgánico e inorgánico a 900, 1500 y 2000  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (std=3)

### 5.1.1.2. Crecimiento de *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

La producción de biomasa seca del cultivo se midió mediante la técnica gravimétrica reportada por APHA,1998. El comportamiento del crecimiento de las tres especies se describe en la figura 10.



**Figura 10:** Crecimiento en logaritmo natural (Ln) de biomasa seca por especie: *Tetraselmis sp.*(A), *Dunaliella sp.*(B) y *Nannochloropsis sp.*(C) (std=3)

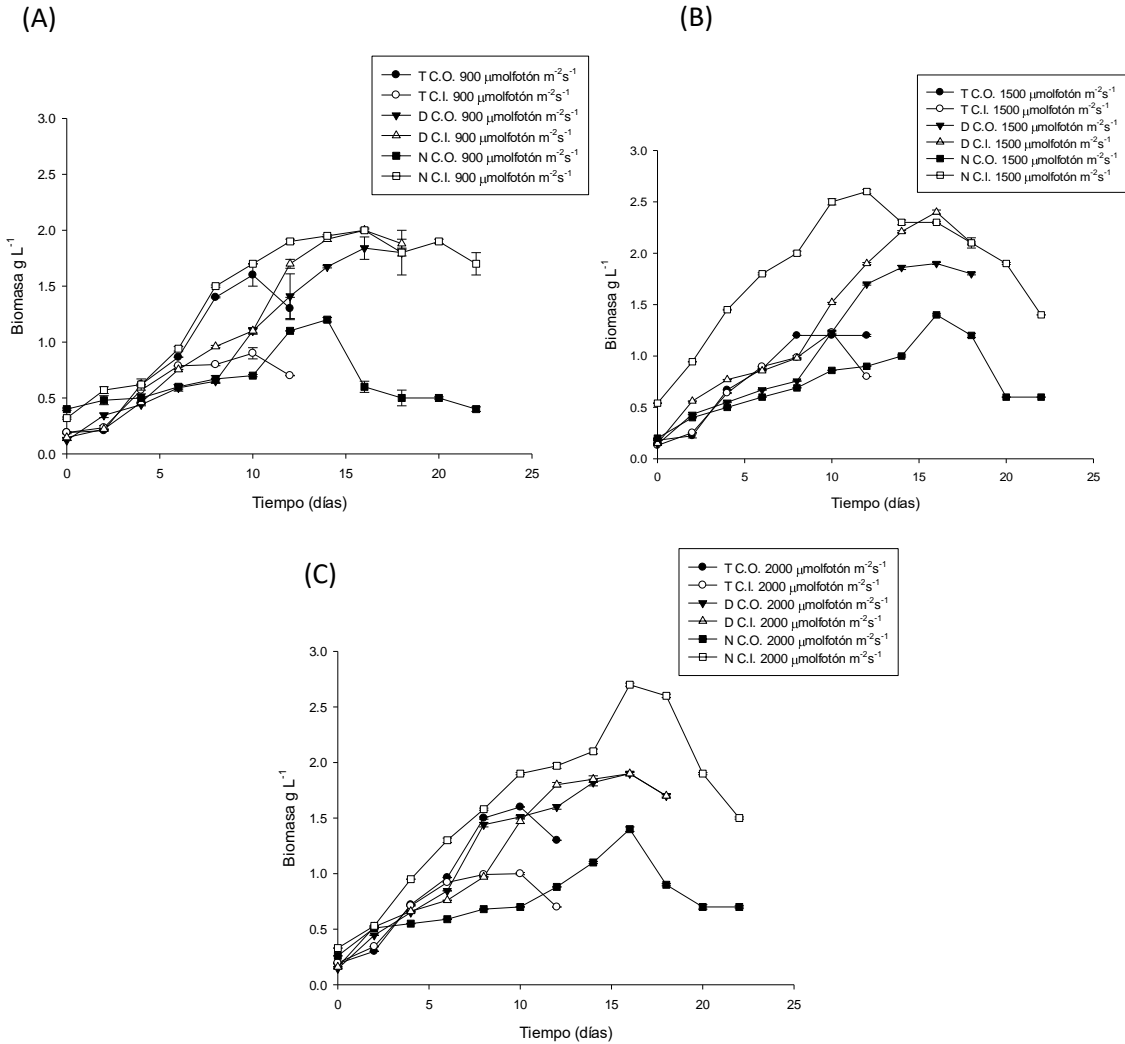
*Tetraselmis sp.* véase figura 10(A) a una densidad de flujo fotónico de 900 y 2000 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> usando carbono orgánico (C.O.) produjo el valor más alto de biomasa el día 10 (1.6±0.2 g L<sup>-1</sup> para 900 y 1.6±0.4 g L<sup>-1</sup> para 2000 μmol foton m<sup>2</sup>s<sup>1</sup>),

una velocidad específica de crecimiento ( $0.1602 \text{ d}^{-1}$  para 900 y  $0.1604 \text{ d}^{-1}$  para 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , siendo menor a lo reportado por Fong Sing *et al.* 2014 de 0.25 y  $0.50 \text{ d}^{-1}$ ), la mayor productividad de biomasa ( $108.3 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  para 900 y 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , siendo menor a lo reportado por Enamala *et al.*, (2018) de  $300 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  en condiciones de detrimento de nitrógeno), así como el tiempo de generación más bajo ( $4.325 \text{ d}$  para 900 y 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

*Dunaliella sp.* vease figura 10(B) a una densidad de flujo fotónico de 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (C.I.) produjo el valor más alto de biomasa el día 16 ( $2.0 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ ); la mayor tasa de crecimiento a 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono orgánico (C.O.) ( $0.1504 \text{ d}^{-1}$ , siendo menor a lo reportado por Enamala, (2018) para *Dunaliella sp.* en estrés= $0.34 \text{ d}^{-1}$ ), así como el tiempo de generación más bajo ( $4.607 \text{ d}$ ). Se obtuvo la mayor productividad de biomasa a 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (C.I.) ( $116.6 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , siendo similar a la productividad de *Dunaliella sp.* en un cultivo batch bajo condiciones de estrés reportado por Shin *et al.*, 2018).

*Nannochloropsis sp.* véase figura 10(C) a una densidad de flujo fotónico de 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (C.I.) produjo el valor más alto de biomasa el día 16 ( $2.7 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ , siendo este valor el más alto de las tres especies); la mayor tasa de crecimiento se obtuvo con el cultivo de 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono orgánico (C.O.) ( $0.1661 \text{ d}^{-1}$ , siendo la mitad del valor de  $0.3794 \text{ d}^{-1}$  reportado por Reyimu y Ozcimen, 2017, siendo esto en *Nannochloropsis oculata* cultivada en aguas residuales municipales).

El tiempo de generación más bajo ( $5.931 \text{ d}$ , siendo de  $1.837 \text{ d}$  el reportado para *Nannochloropsis oculata* por Reyimu y Ozcimen, 2017) y la mayor productividad de biomasa ( $77.27 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , con respecto a lo reportado por Enamala *et al.*, (2018) de  $170 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) se obtuvieron a 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (C.I.).



**Figura 11:** Comparación de crecimiento de biomasa por densidad de flujo de fotones  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (A),  $1500 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (B) y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (C) (std=3). Donde: N=*Nannochloropsis* sp. D= *Dunaliella* sp. y T= *Tetraselmis* sp.

Al comparar la producción de biomasa entre especies a una misma densidad de flujo de fotones véase figura 11 se obtuvieron los siguientes resultados:

Para  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  *Nannochloropsis* sp. cultivada con carbono inorgánico obtuvo el mayor valor siendo  $2.7 \text{ g L}^{-1}$  véase figura 11(A).

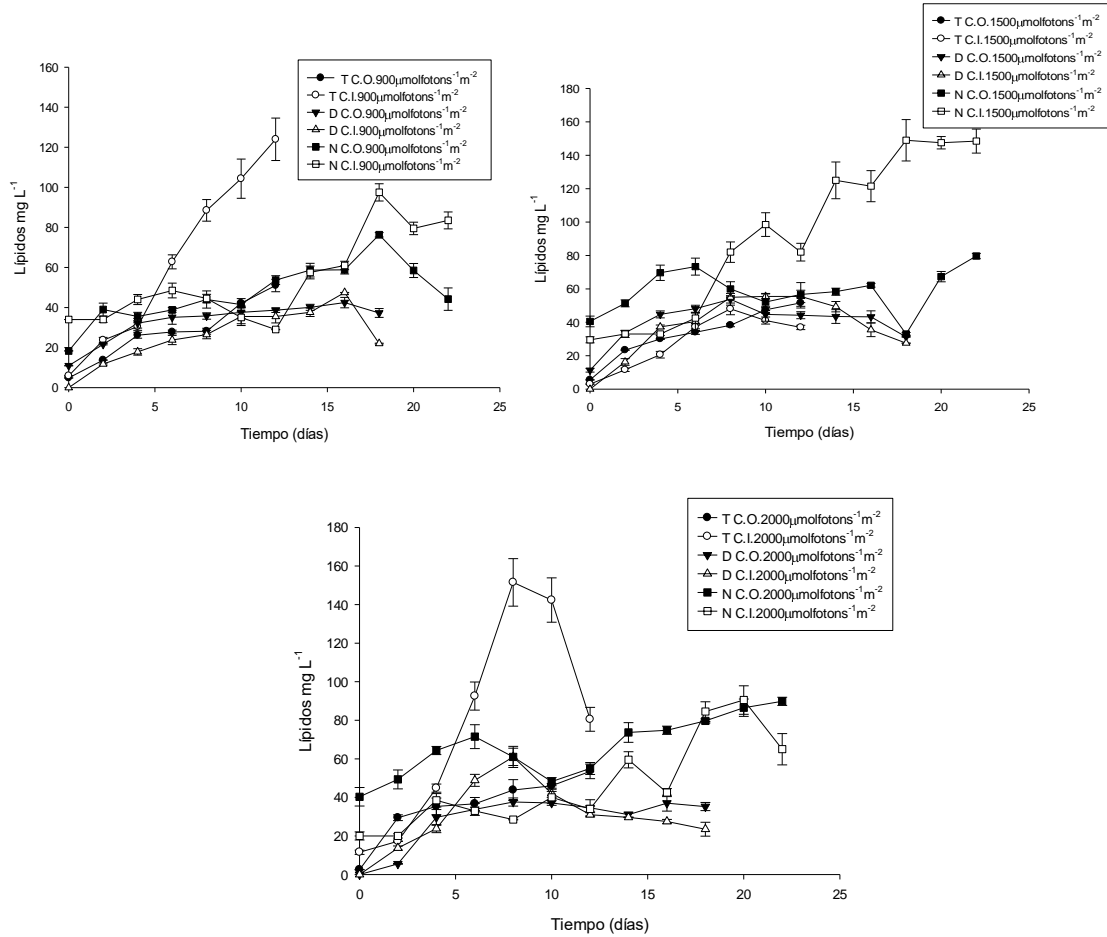
Al realizar un análisis de varianza (ANOVA a  $p>0.05$ ) se obtuvo que hay diferencias significativas entre especies, por lo que al realizar una prueba de Tukey se obtuvo hay diferencias entre *Tetraselmis* sp. cultivada con carbono orgánico y *Dunaliella*

*sp.* cultivada con carbono orgánico, *Nannochloropsis sp.* con carbono inorgánico y *Tetraselmis sp.* con carbono inorgánico tienen diferencias significativas, así como *Nannochloropsis sp.* cultivada con carbono orgánico y *Nannochloropsis sp.* cultivada con carbono inorgánico. Para 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  *Nannochloropsis sp.* cultivada con carbono inorgánico obtuvo el mayor valor siendo 2.7 g L<sup>-1</sup> véase figura 11(B). El análisis ANOVA ( $p > 0.05$  al 95% de confianza) dio como resultado diferencias significativas entre especies: *Tetraselmi sp.* con carbono orgánico con *Dunaliella sp.* con carbono orgánico y *Nannochloropsis sp.* con carbono inorgánico tiene diferencias significativas, así como *Tetraselmi sp.* C.I. con *Nannochloropsis sp.* C.I., *Dunaliella sp.* C.O. y *Nannochloropsis sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.* C.O. con *Nannochloropsis sp.* C.I. tienen diferencias significativas.

Para 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase figura 11(C) se obtuvo el valor de biomasa más alto para *Nannochloropsis sp.* cultivada con carbono inorgánico (2.7 g L<sup>-1</sup>). El análisis de varianza dio como resultado que hay diferencias significativas y la prueba de Tukey dio como resultado que estas diferencias son entre los siguientes cultivos: *Tetraselmis sp.* C.O., *Dunaliella sp.* C.O. y *Nannochloropsis sp.* C.I.; *Tetraselmis sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.* C.O. con *Nannochloropsis sp.* C.I. tienen diferencias significativas.

La especie de *Nannochloropsis sp.* sometida a 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de densidad de flujo fotónico y usando carbono inorgánico obtuvo los valores más altos de producción de biomasa. Para lípidos obtuvo 90.5 $\pm$ 10 mg L<sup>-1</sup> y clorofila 2.742  $\mu\text{g L}^{-1}$ , siendo menor a los 151 $\pm$ 31 mg L<sup>-1</sup> de lípidos producidos por *Tetraselmis sp.* y menor a la clorofila producida por *Dunaliella sp.* (10.551 $\pm$ 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

## 5.2 Producción de lípidos y clorofila con *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*



**Figura 12:** Comparación de producción de lípidos: 900  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (A), 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (B) y 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (C) (std=3). Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

Al comparar la producción de lípidos de las tres especies a una misma densidad de flujo de fotones se obtuvieron los siguientes resultados: Para 900  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase *figura 12(A)* *Tetraselmis sp.* cultivada con carbono inorgánico obtuvo la mayor producción de lípidos  $124 \pm 20 \text{ mg L}^{-1}$ , productividad de  $16.66 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  y un porcentaje lípidos/peso seco de 77%. El análisis de varianza (ANOVA) véase **Anexo** y la prueba de Tukey dieron como resultado diferencias significativas entre especies: *Tetraselmis sp.* C.O. con *Tetraselmis sp.* C.I., *Dunaliella sp.* C.O. y

*Nannochloropsis* sp. C.I.; *Tetraselmis* sp. C.I. con *Dunaliella* sp. C.O y *Dunaliella* sp. C.I.; *Dunaliella* sp. C.I. y *Nannochloropsis* sp. C.I. tienen diferencias significativas. Para 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase figura 12(B) *Nannochloropsis* sp. C.I. obtuvo la producción más alta:  $148.5 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$ . Los valores reportados por Ferrer, 2010 en la producción de lípidos en efluentes de aguas residuales industriales de 133 a 140  $\text{mg L}^{-1}$  son similares a los reportados en el proyecto para *Nannochloropsis* sp. La productividad de lípidos totales fue de  $30.75 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , siendo menor a lo reportado por Enamala, (2018) de  $54 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  y la mayor proporción de lípidos/peso seco fue de 76%, siendo de 28.7 % en cultivo de *Nannochloropsis* sp. con deficiencia de nutrientes lo reportado por Gouveia y Oliveira, (2009).

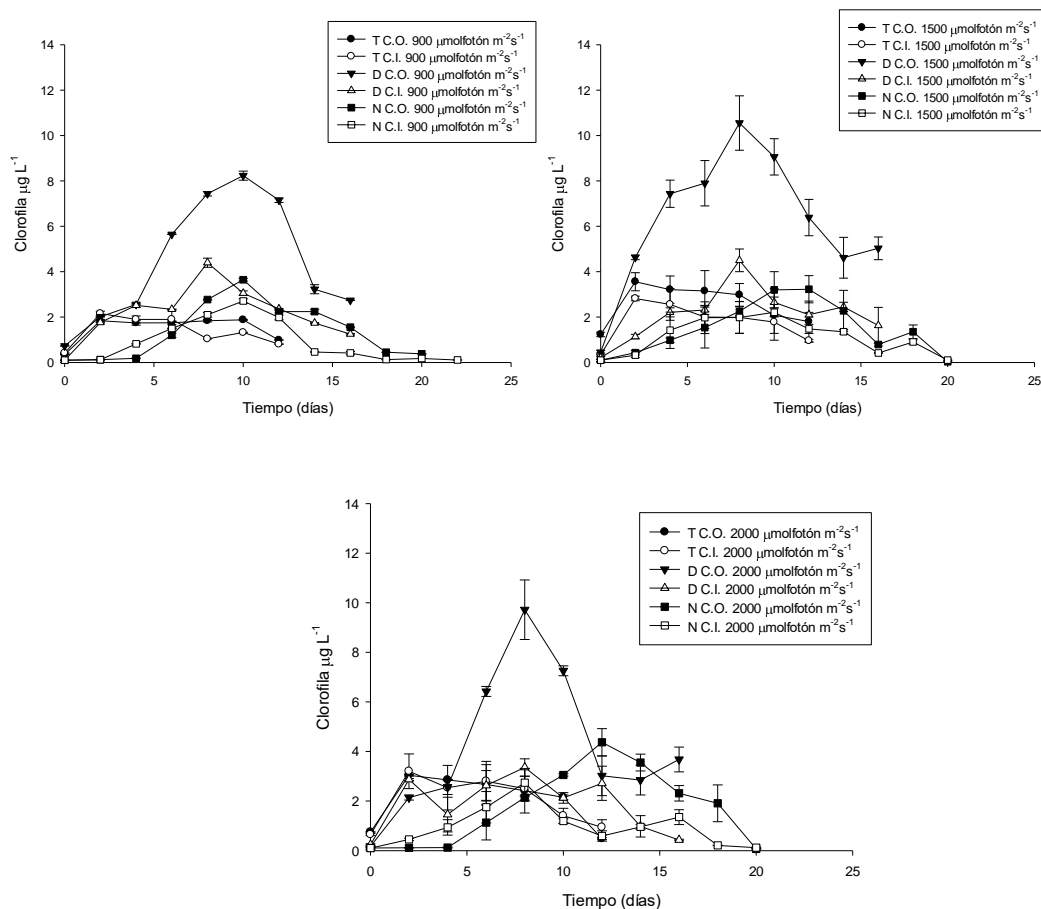
El análisis ANOVA y prueba de Tukey dieron como resultado diferencias significativas entre especies: *Nannochloropsis* sp. C.I. tiene diferencias significativas con *Nannochloropsis* sp. C.O. con *Dunaliella* sp. C.O. y C.I., *Tetraselmis* sp. C.O. y C.I.; *Tetraselmis* sp. C.I. con *Nannochloropsis* sp. C.O. tuvieron diferencias significativas.

Para véase figura 12(C) *Tetraselmis* sp. usando  $\text{CO}_2$  atmosférico como fuente de carbono (C.I.) sometido a una densidad de flujo fotónico de 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtuvo el valor más alto de lípidos totales el día 12 :  $151.5 \pm 31 \text{ mg L}^{-1}$ . Este valor es el más alto de todas las especies y condiciones y es similar al valor reportado por Ferrer, (2010) en aguas residuales industriales de 133.6 a 140.9  $\text{mg L}^{-1}$ .

*Tetraselmis* sp. C.I. usando 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtuvo la mayor productividad de lípidos totales ( $31.25 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , siendo semejante a la reportada por Enamala *et al.*, (2018) la cual fue de  $27.4 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y la mayor proporción de lípidos/peso seco (84%, siendo el reportado en *Tetraselmis chunii* por Cerón, (2013) de 17% en condiciones de detrimento de nutrientes).

El análisis de varianza resultó en diferencias significativas: *Tetraselmis* sp. C.O. con *Tetraselmis* sp. C.I. y *Nannochloropsis* sp. C.O.; *Tetraselmis* sp. C.I. con *Dunaliella* sp. C.O. y C.I. y *Nannochloropsis* sp. C.I.; *Dunaliella* sp. C.O. y *Dunaliella* sp. C.I. con *Nannochloropsis* sp. C.O. tienen diferencias significativas. *Tetraselmis* sp. en 900 y 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.I. fue la especie que obtuvo producción de lípidos más alta y se seleccionó para el análisis de perfil de ácidos grasos véase Tabla 9 y

Tabla 10.



**Figura 13:** Comparación de producción de clorofila: 900 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (A), 1500 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (B) y 2000 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (C) (std=3). Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

La comparación de la producción de clorofila entre las tres especies dio los siguientes resultados: Para 900 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> véase figura 13(A) *Dunaliella sp.* C.O. tuvo el valor de producción más alto 8.231±0.1 µg L<sup>-1</sup> (dentro del intervalo de 9.2 a 3.2 µg L<sup>-1</sup> reportado por Cáceres, 2009).

Hubo diferencias significativas entre especies véase Anexo (ANOVA p<0.05 y prueba de Tukey) siendo estas las siguientes: *Tetraselmis sp.* C.O. y C.I. con *Dunaliella sp.* C.O.; *Dunaliella sp.* C.O. con *Dunaliella sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.*



C.O. y C.I. Para 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase figura 13(B) *Dunaliella sp.* C.O. tuvo el valor más alto de producción:  $10.551 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (mayor a la producción reportada por Cáceres, 2009), este valor el más alto de las tres especies y productividad de clorofila de  $0.106 \mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Los resultados del análisis de varianza ANOVA arrojaron que entre las tres especies hay diferencias significativas: *Tetraselmis sp.* C.O. y C.I. con *Dunaliella sp.* C.O.; *Dunaliella sp.* C.O. con *Dunaliella sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.* C.O. y C.I. Con la densidad de flujo de fotones de 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase figura 13(C) *Dunaliella sp.* C.O. tuvo la mayor producción:  $9.718 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  y una productividad de  $0.506 \mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  (siendo este valor el mayor de productividad). El análisis de varianza dio como resultado diferencias significativas entre especies: *Tetraselmis sp.* C.O. y C.I. con *Dunaliella sp.* C.O.; *Dunaliella sp.* C.O. con *Dunaliella sp.* C.I. y *Nannochloropsis sp.* C.O. y C.I. *Dunaliella sp.* cultivada con fuente de carbono orgánico fue la especie que produjo una maor cantidad de clorofila. Las tablas de productividades 4,5 y 6 por especie resumen lo anterior:

**Tabla 4.** Productividades *Tetraselmis sp.*

	<i>Tetraselmis sp.</i>					
	C.O			C.I		
<i>Densidad de flujo fotónico</i> ( $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	900	1500	2000	900	1500	2000
<i>Biomasa</i> ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.6 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1	1.23 $\pm$ 0.3	1 $\pm$ 0.1
<i>Tasa de crecimiento</i> ( $\text{d}^{-1}$ )	0.1602	0.158	0.1604	0.1086	0.1514	0.1056
<i>Tiempo de generación</i> (d)	4.325	4.384	4.325	6.378	4.577	6.56
<i>Productividad biomasa</i> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	108.3	100	108.3	58.23	66.66	55.38
<i>Lípidos</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	51 $\pm$ 12	51.66 $\pm$ 9	53.5 $\pm$ 11	124 $\pm$ 20	48.05 $\pm$ 5	151.5 $\pm$ 31
<i>Productividad lípidos</i> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	21.25	21.52	22.29	16.66	20.02	31.25
<i>Proporción lípidos/peso seco</i> (%)	39	43	41	77	60	84
<i>Clorofila</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1.839 $\pm$ 0.2	3.558 $\pm$ 0.01	3.039 $\pm$ 0.4	2.16 $\pm$ 0.1	2.821 $\pm$ 0.05	3.203 $\pm$ 0.04
<i>Productividad clorofila</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	0.164	0.3	0.8	0.134	0.16	0.158

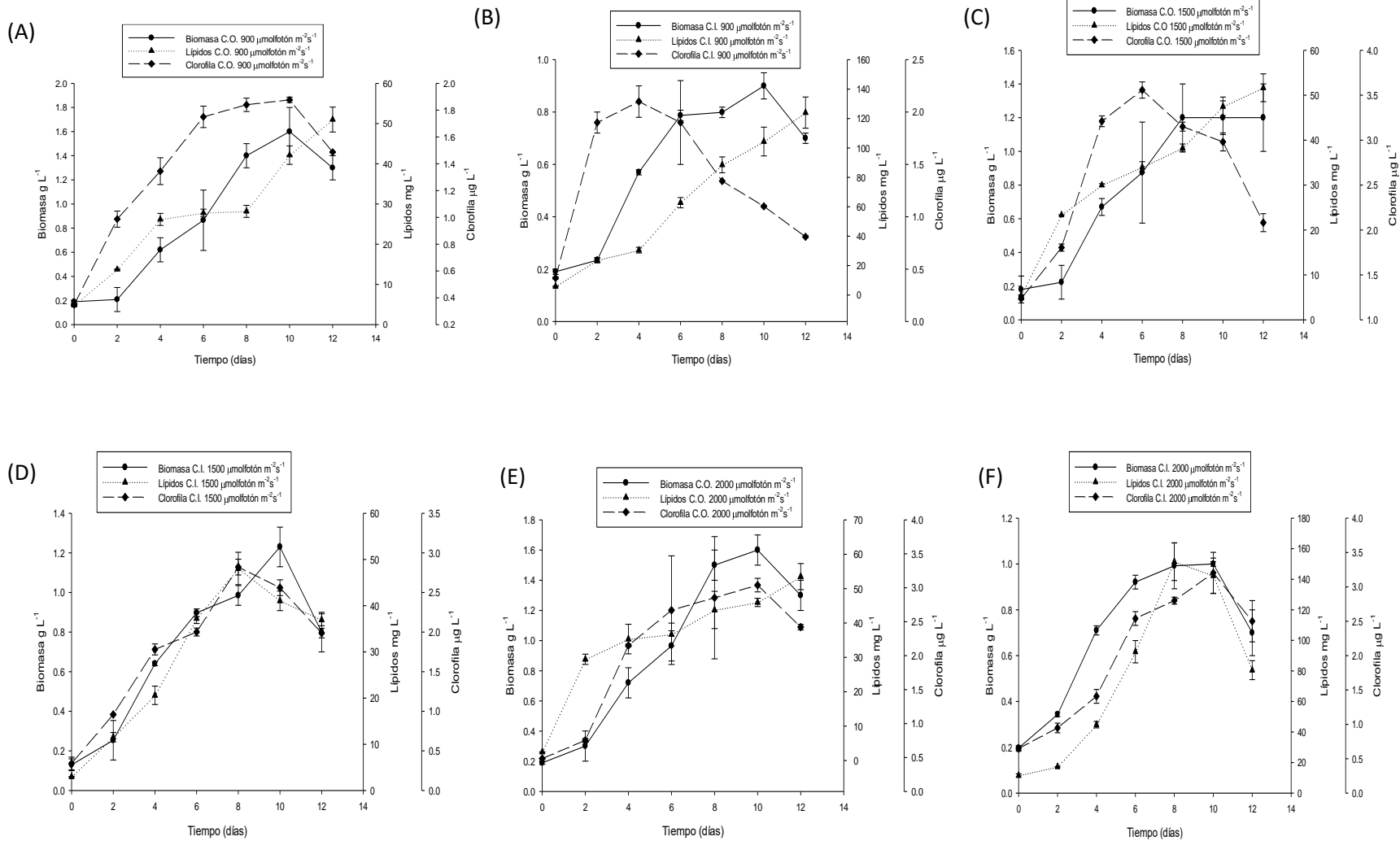
**Tabla 5.** Productividades *Dunaliella sp.*

	<i>Dunaliella sp.</i>					
	C.O.			C.I.		
	900	1500	2000	900	1500	2000
<b>Densidad de flujo fotónico</b> ( $\mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )						
<b>Biomasa</b> ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.84±0.5	1.9±0.7	1.94±0.2	2±0.3	2.4±0.3	1.9±0.2
<b>Tasa de crecimiento</b> ( $\text{d}^{-1}$ )	0.1504	0.1418	0.1371	0.1419	0.1466	0.1312
<b>Tiempo de generación</b> (d)	4.607	4.885	5.054	4.882	4.727	5.279
<b>Productividad biomasa</b> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	100	100	94.44	100	116.6	94.44
<b>Lípidos</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	42.45±10	53.78±8	37.6±2	47.5±11	55.5±5	48.82±7
<b>Productividad lípidos</b> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	20.71	17.3	19.5	12.2	15.27	13.05
<b>Proporción lípidos/peso seco</b> (%)	20.1	19.4	25.65	21.5	28.4	32.8
<b>Clorofila</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	8.231±0.1	10.551±0.5	9.718±0.6	4.396±0.9	4.5±0.3	3.355±0.1
<b>Productividad clorofila</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	0.119	0.106	0.503	0.393	0.350	0.453

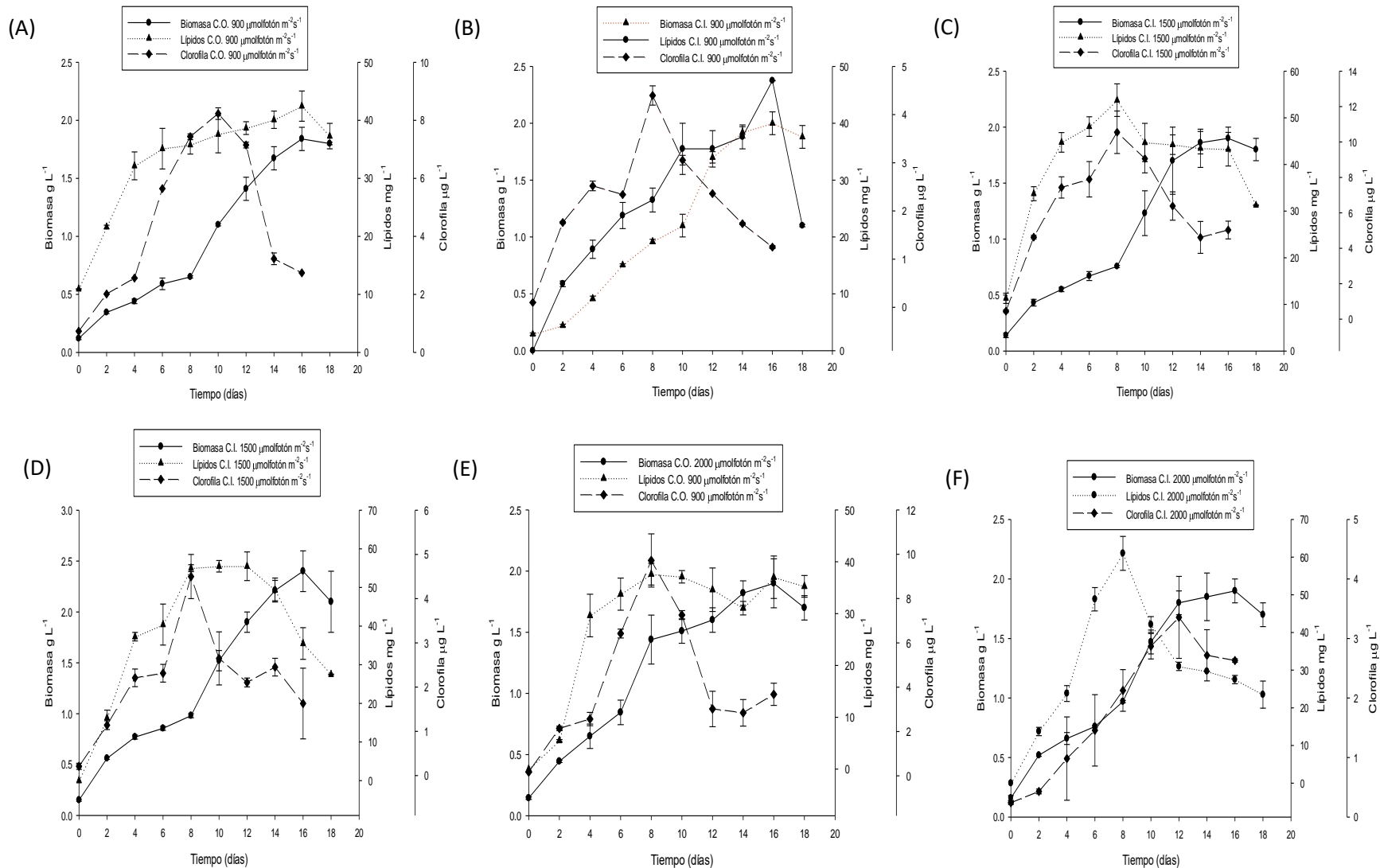
**Tabla 6.** Productividades *Nannochloropsis sp.*

	<i>Nannochloropsis sp.</i>					
	C.O.			C.I.		
	900	1500	2000	900	1500	2000
<b>Densidad de flujo fotónico</b> ( $\mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )						
<b>Biomasa</b> ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.2±0.1	1.4±0.3	1.4±0.1	1.95±0.1	2.7±0.2	2.7±0.2
<b>Tasa de crecimiento</b> ( $\text{d}^{-1}$ )	0.1445	0.1661	0.1359	0.1168	0.1046	0.1148
<b>Tiempo de generación</b> (d)	15.54	10.47	11.69	5.931	6.622	6.037
<b>Productividad Biomasa</b> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	18.181	27.27	31.81	77.27	63.63	68.18
<b>Lípidos</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	76.33±5	79.66±10	89.83±5	97.5±11	148.5±15	90.5±10
<b>Productividad lípidos</b> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	17.34	18.1	20.41	22.15	30.75	20.56
<b>Proporción lípidos/peso seco</b> (%)	52	75	77	74	76	65
<b>Clorofila</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	3.644	3.228	4.373	2.707	2.209	2.742
<b>Productividad clorofila</b> ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	0.33	0.29	0.39	0.24	0.2	0.24

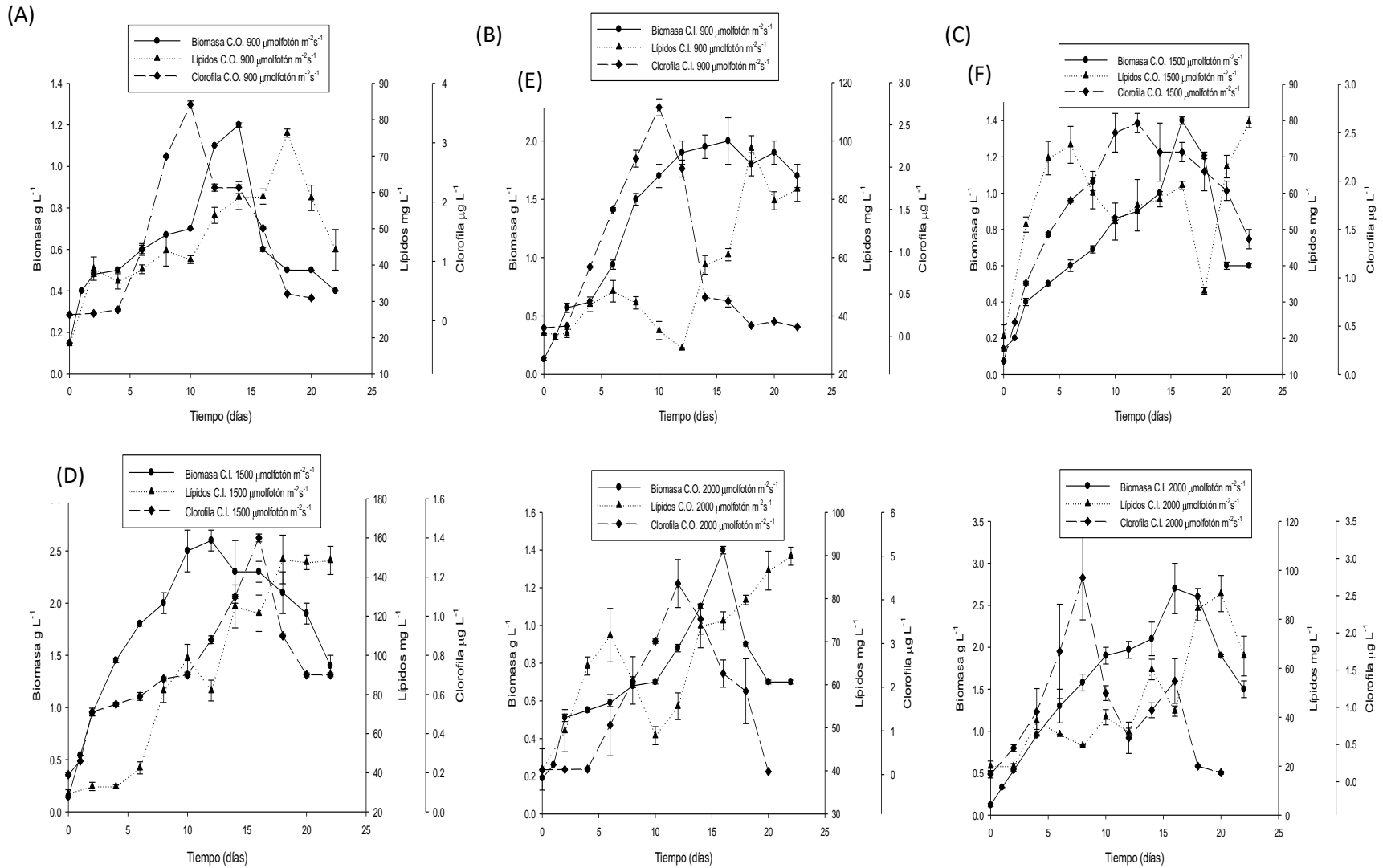
5.2.1. Relación entre producción de biomasa, lípidos y clorofila con *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*



**Figura 14.** Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con *Tetraselmis sp.* (A) 900 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (B) 900 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I.(C) 1500 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (D) 1500 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I., (E) 2000 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O. y (F) 2000 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I.



**Figura 15.** Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con *Dunaliella sp.* (A) 900 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (B) 900 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> C.I.(C) 1500 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (D) 1500 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I., (E) 2000 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O. y (F) 2000 µmolfotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I.



**Figura 16.** Producción de lípidos totales con *Nannochloropsis sp.* (A) 900 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (B) 900 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I.(C) 1500 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O., (D) 1500 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I., (E) 2000 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.O. y (F) 2000 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>C.I.(std=3).

En *Tetraselmis sp.* la biomasa, clorofila y lípidos se relacionan entre si véase *figura 14*. Los cultivos a una densidad de flujo de fotones de  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. y C.I.,  $1500 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. siguen un mismo patrón, siendo entre el día 8 y 10 el inicio de la fase estacionario y el decremento en la producción de biomasa y clorofila, mientras que a la par hay un aumento en la producción de clorofila en estrés por detrimento de nutrientes véase *figuras 15(A), (B), (C) y (E)*. Mientras que en los cultivos con densidad de flujo de fotones de de  $1500$  y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico se observa un comportamiento de la producción de lípidos diferente, donde los lípidos, clorofila y biomasa descieden a la par desde el día 8-10, coincidiendo con el estrés por falta de nutrientes véase *figuras 15(D) y (F)*.

En *Dunaliella sp.* a  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico véase *figura 16(B)* se observa que el comportamiento de clorofila, biomasa y lípidos tiene una tendencia similar, siendo el día 16 el inicio de la fase estacionaria y la posterior disminución de biomasa, clorofila y lípidos. En las demás gráficas se observa que la disminución de la producción de clorofila comienza desde el día 8 véase *figura 16(A), (C), (D), (E) y (F)*, así tambien lípidos y biomasa van ligados, excepto en  $1500 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico véase *figura 16(D) y (F)* donde lípidos esa ligada a clorofila siguiendo una misma tendencia.

En *Nannochloropsis sp.* se observa que  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.I.,  $1500 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. y C.I. y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. véase *figura 16(B), (C), (D) y (E)* clorofila y biomasa tienen una tendencia similar (clorofila comienza el descenso de producción de los días 8 al 15, mientras que biomasa comienza su fase de muerte desde el día 18-20) mientras que lípidos aumenta y mantiene alta la producción durante la fase de muerte y estrés. Para  $900 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.O. y  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  C.I. véase *figura 16(A) y (F)* clorofila, biomasa y lípidos siguen la misma tendencia, estando lípidos más relacionado con la tendencia de biomasa comenzando su descenso de producción desde el día 18-20, mientras que clorofila comienza su descenso el día 8-10.

### 5.2.2. Comparación entre la producción de lípidos descrita en la bibliografía y los resultados obtenidos con *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

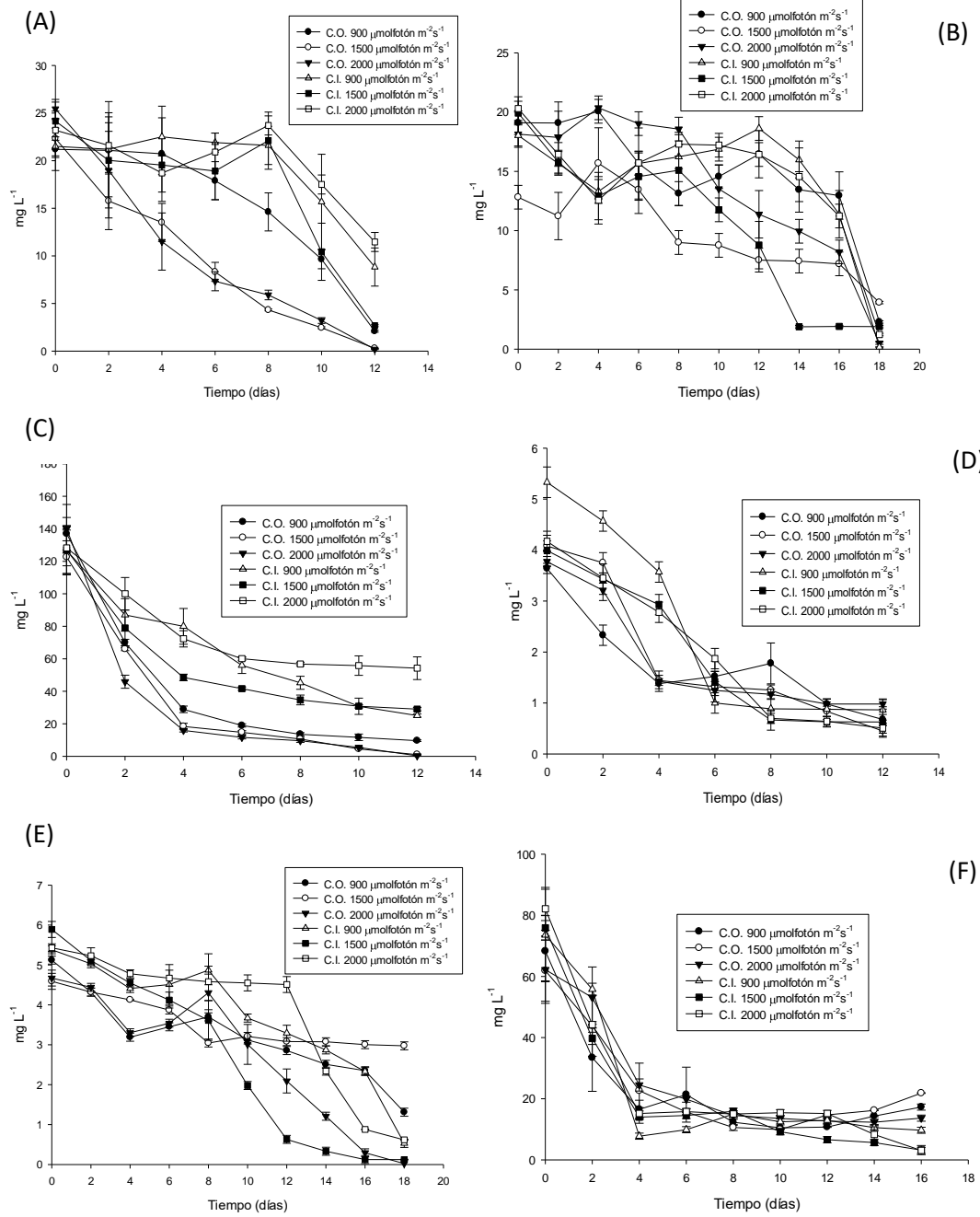
Al analizar la productividad de lípidos y el contenido de ácidos grasos en porcentaje de peso seco de las tres especies utilizadas (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*) en comparación a otras especies marinas y dulceacuícolas sometidas a diferentes tipos de estrés (supresión de nitrógeno, deficiencia de nitrógeno, cultivo con suficiencia de nutrientes, cultivo heterotrófico y ausencia de nutrientes) se llegó a la conclusión de que el porcentaje de ácidos grasos en relación al peso seco tienen valores altos siendo 84% y 62.06% en *Tetraselmis sp.* y 77% en *Nannochloropsis sp.* Estos valores son similares a *Scenedesmus rubescens* sometido a estrés por ausencia de nutrientes (73% reportado por Matsunaga *et al.*, 2009) y el cual tiene el porcentaje más alto encontrado en la bibliografía. Para la productividad de lípidos los valores reportados de estrés por ausencia de nitrógeno en *Nannochloropsis sp.* (204 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> por Rodolfi *et al.*, 2009) y en los cultivos con suficiencia de nutrientes con *Nannochloropsis oculata* (151 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Chiu *et al.*, 2009) son mayores a los reportados en los resultados experimentales de este proyecto (30.75 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), así como *Dunaliella sp.* tiene un valor similar de productividad (20.71 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) al reportado bibliográficamente en cultivos con insuficiencia de nutrientes (33.5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Tagaki *et al.*, 2006) siendo también semejante obtenido experimentalmente de *Tetraselmis sp.* (31.25 y 34.64 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) siendo productividades mayores a algunas especies dulceacuicolar sometidas a estrés por ausencia de nitrógeno como son el caso de *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* (Li *et al.*, 2008 y Francisco *et al.*, 2010). Toda la información descrita se resume en la tabla 7.

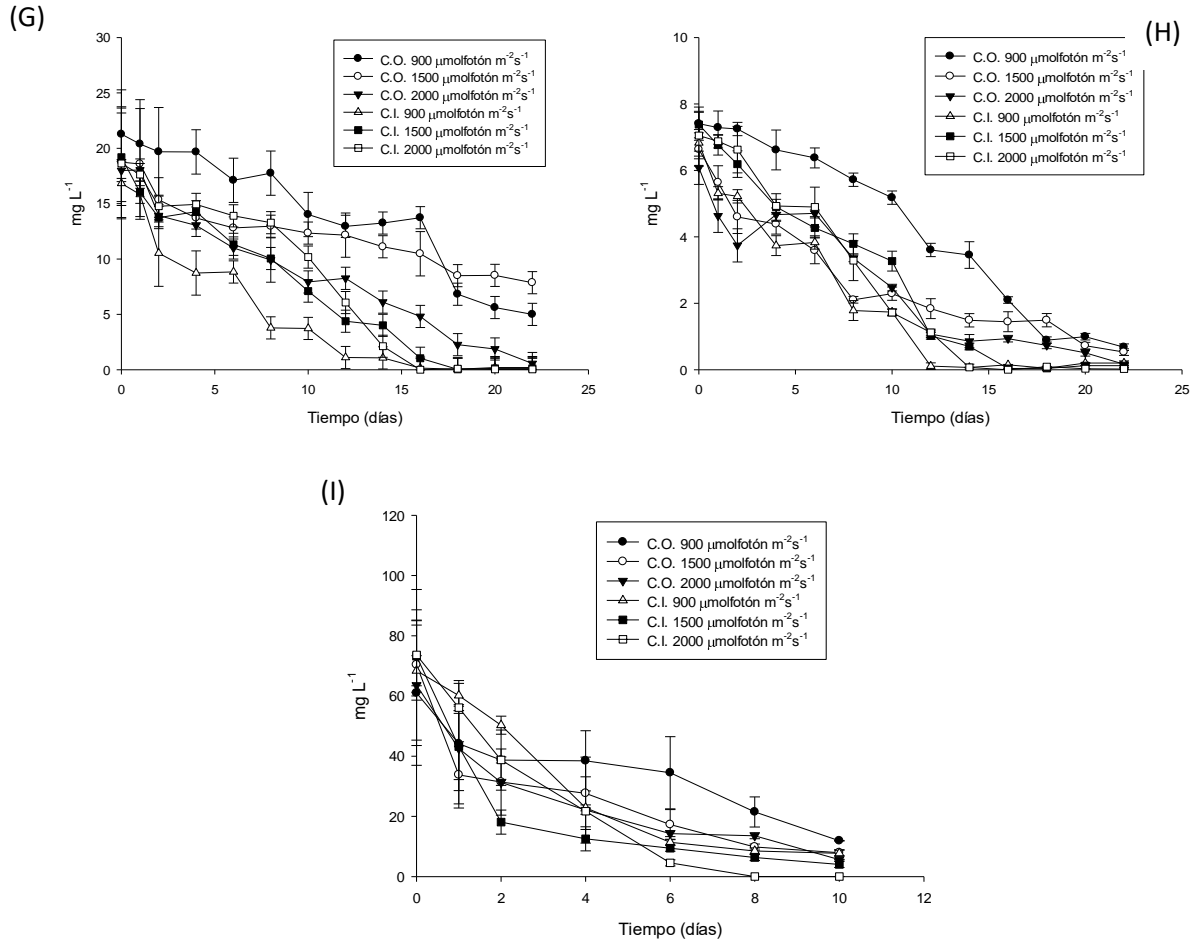
**Tabla 7.** Contenido de aceites de algunas especies de microalgas (Tomado de Loera-Quezada *et al.*, 2010)

Especie	Contenido de ácidos grasos (% de peso seco)	Productividad de lípidos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referencia
<b>Información bibliográfica</b>			
<i>Parietochoris incisa</i> (d)	60 <sup>a</sup>	NR	Solovchenko et al. (2008)
<i>Nannochloropsis sp.</i> (m)	60 <sup>a</sup>	204	Rodolfi et al. (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	56 <sup>a</sup>	13.22	Gouveia et al. (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	42 <sup>a</sup>	12.77	Widjaja et al. (2009)
<i>Cryptocodinium conhnii</i> (m)	41.14 <sup>a</sup>	82	Mendoza et al. (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i> (d)	43 <sup>b</sup>	NR	Mandal y Mallick (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	38 <sup>c</sup>	133	Li et al. (2008)
<i>Nannochloropsis sp.</i> (m)	28.7 <sup>c</sup>	90	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	27 <sup>c</sup>	127.2	Francisco et al. (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i> (m)	30.7 <sup>c</sup>	151	Chiu et al. (2009)
<i>Dunaliella sp.</i> (m)	67 <sup>c</sup>	33.5	Tagaki et al. (2006)
<i>Choricystis minor</i> (d)	21.3 <sup>c</sup>	82	Mazzuca-Sobezuk y Chisti (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> (d)	50.3 <sup>d</sup>	NR	Xiong et al. (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	21 <sup>d</sup>	54	Liang et al. (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i> (m)	73 <sup>e</sup>	NR	Matsunaga et al. (2009)
<b>Resultados Experimentales</b>			
<i>Tetraselmis sp.</i> (m)	84 (C.I. 2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	31.25(C.I. 2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Resultados del presente proyecto
<i>Tetraselmis sp.</i> (m) segunda fase	62.06 (900 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	34.64 (2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Resultados del presente proyecto
<i>Dunaliella sp.</i> (m)	32.8 (C.I. 2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	20.71 (C.O. 900 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Resultados del presente proyecto
<i>Nannochloropsis sp.</i> (m)	77 (C.O. 2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	30.75 (C.I. 1500 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Resultados del presente proyecto
<sup>a</sup> Cultivo bajo supresión de nitrógeno, <sup>b</sup> Cultivo bajo deficiencia de nitrógeno, <sup>c</sup> Cultivo con suficiencia de nutrientes, <sup>d</sup> Cultivo heterotrófico, <sup>e</sup> Ausencia de nutrientes, m= marina, d=dulceacuícola, NR= No Reportado.			



### 5.3 Remoción de nutrientes: remoción de nitrógeno con *Tetraselmis sp*, *Dunaliella sp* y *Nannochloropsis sp*.





**Figura 17.** Remoción de nitrógeno con *Tetraselmis sp.* (A) Remoción de nitrato, (C) remoción de nitrito y (E) remoción de amonio, con *Dunaliella sp.* (B) Remoción de nitrato, (D) remoción de nitrito y (F) remoción de amonio y con *Nannochloropsis sp.* (G) Remoción de nitrato, (H) remoción de nitrito y (I) remoción de amonio (std=3).

Las tres especies de microalgas (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*) fueron sometidas a un análisis de remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno inorgánico (nitrato y nitrito) ya que el metabolismo del nitrógeno se relaciona con la síntesis de clorofila, el crecimiento celular y el metabolismo de los lípidos.

Para *Tetraselmis sp.* el mayor porcentaje de remoción para nitrato se logró al aplicar 2000  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  cultivando *Tetraselmis sp.* con carbono orgánico (99.26%)

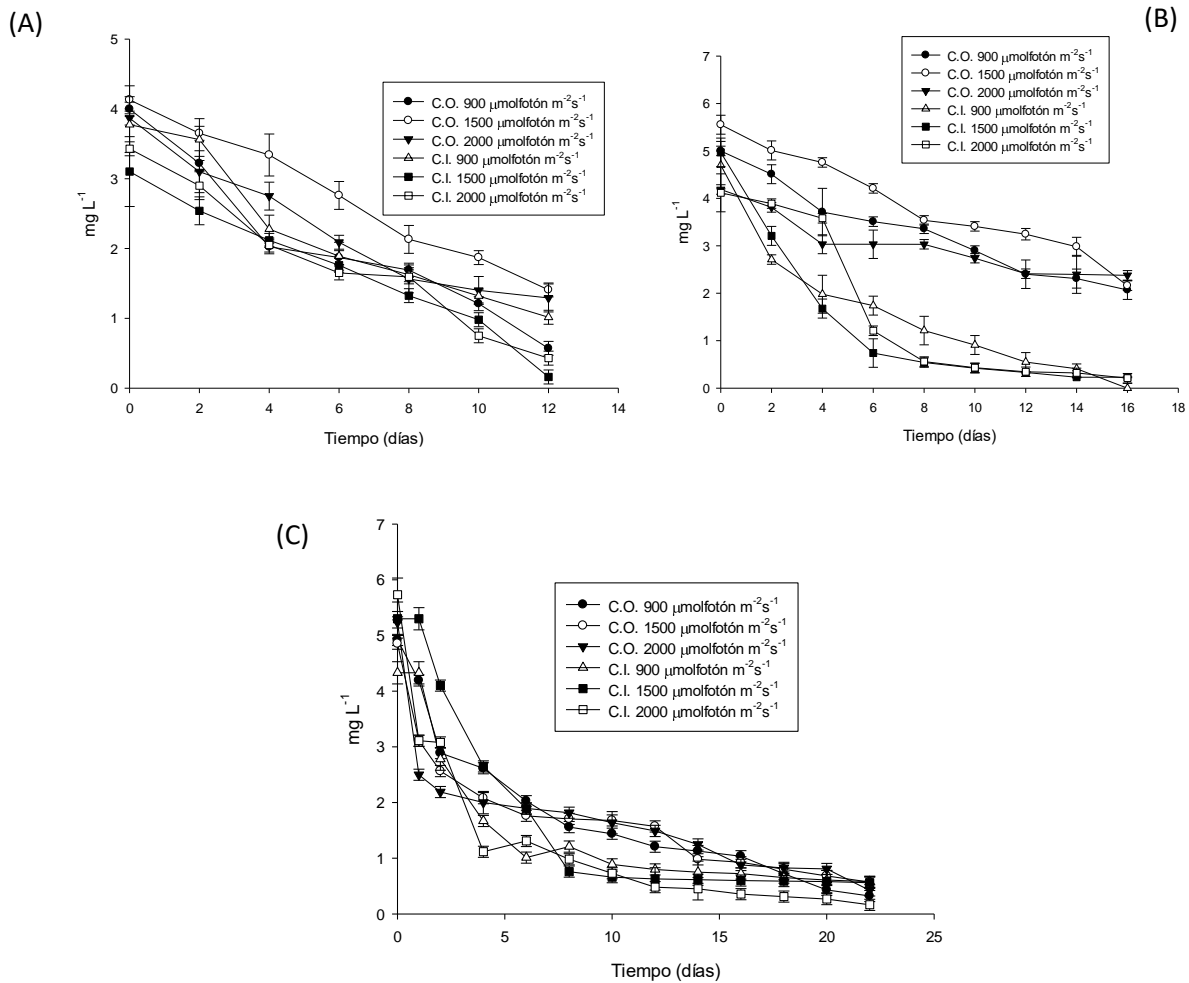
véase figura 17(A). El aumento de nitrato el día 8 se puede explicar por remineralización de biomasa muerta en el medio de cultivo. Para nitrito se obtuvo a una densidad de flujo fotónico de  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  cultivando *Tetraselmis sp.* con carbono inorgánico (87.84) véase figura 17(C) y para amonio a una densidad de flujo fotónico de  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  cultivando *Tetraselmis sp.* con carbono orgánico (99.77%) véase figura 17(E). Los valores reportados por Zaballa *et al.*, (2016) de 64-75% de remoción de nitratos, nitritos y amonio para clorofitas son menores que los reportados en este ensayo.

Para *Dunaliella sp.* el mayor porcentaje de remoción para nitrato con *Dunaliella sp.* se logró a la densidad de flujo fotónico de  $900 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico como fuente de carbono (99.03%) véase figura 17(B). El aumento de nitrato el día 12 se puede explicar por remineralización de biomasa muerta en el medio de cultivo. Para nitrito se removió el mayor porcentaje usando una densidad de flujo fotónico de  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono orgánico como fuente de carbono (99.52) véase figura 17(D) y para amonio fue  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico (96.22%) véase figura 17(F). Los valores reportados por Rocha, (2014) de remoción de nitrógeno en aguas residuales por microalgas marinas están en el rango de 74.34% a 91.05%, siendo más altos los reportados en este estudio.

Para *Nannochloropsis sp.* el mayor porcentaje de remoción para nitrato se alcanzó usando una densidad de flujo de fotones de  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico como fuente de carbono (99.84%) véase figura 17(G). Para nitrito el mayor porcentaje de remoción fue usando  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones y cultivado con carbono inorgánico (99.58%) véase figura 17(H) y para amonio el porcentaje de remoción mayor fue a una densidad de flujo fotónico de  $2000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (99.95%) véase figura 17(I). Los valores reportados para la remoción de amonio, nitratos y nitrito son mayores que los reportados en clorofitas por Chacón *et al.*, (2004) (44%).

#### 5.4 Remoción de ortofosfatos con *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

En este análisis se obtuvo la remoción de fósforo reactivo soluble, el cual cumple un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de los cultivos de microalgas, ya que este elemento se encuentra en diferentes compuestos importantísimos para la vida del cultivo, tales compuestos podrían ser el material genético (enlace fosfodiéster del DNA y RNA) y los compuestos útiles para el intercambio energético como el ADP y ATP.



**Figura 18.** Remoción de ortofosfatos con *Tetraselmis sp.* (A) *Dunaliella sp.*, (B) y (C) *Nannochloropsis sp.*(std=3)

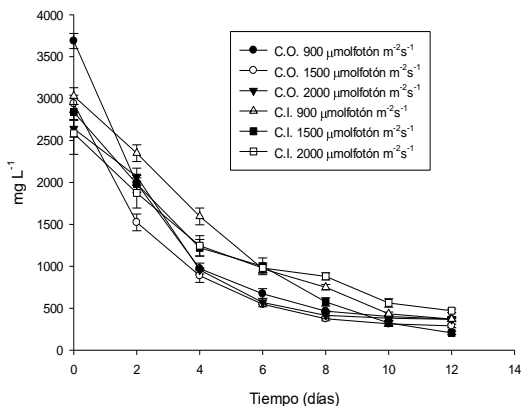
El porcentaje de remoción de fosfatos más alto para *Tetraselmis sp.* se dio en el cultivo con una densidad de flujo de fotones de 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico como fuente de carbono (94.76%) véase figura 18(A).

Para *Dunaliella sp.* el valor de remoción más alto se obtuvo en el cultivo con una densidad de flujo de fotones de 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico (89.13%) véase figura 18(B). Para *Nannochloropsis sp.* el porcentaje de remoción de fosfatos más alto al someterse a un flujo de fotones de con 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico (97.13%) véase figura 18(C). Las remociones obtenidas experimentalmente son parecidas a las reportadas por Pérez-Hernandez y Labbé (2014) para un cultivo mixto de microalgas para aguas residuales municipales (95%-99%

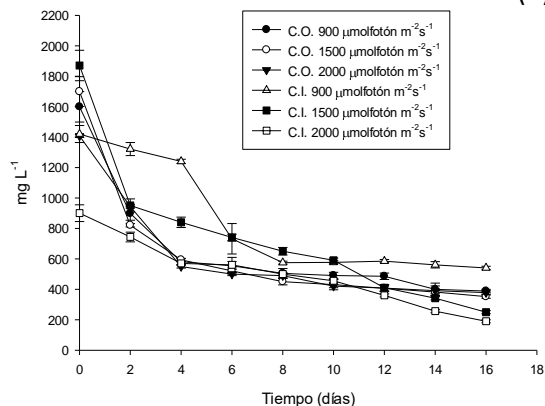
### 5.5. Determinación de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) en cultivos con *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

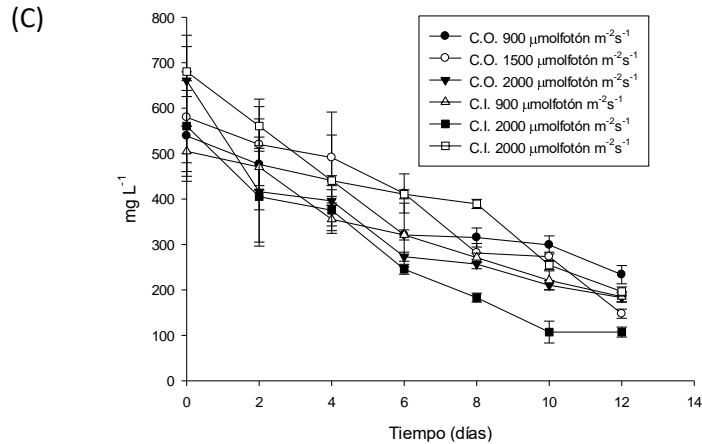
La prueba de demanda química de oxígeno (DQO) permite determinar la cantidad de materia orgánica e inorgánica disuelta que se encuentra en una determinada muestra de agua.

(A)



(B)





**Figura 19.** Remoción de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) para *Tetraselmis sp.* (A) *Dunaliella sp.*, (B) y (C) *Nannochloropsis sp.*(std=3).

El perfil de remoción del contenido de materia orgánica disuelta medida como DQO en cultivos de *Tetraselmis sp.* más alto se dio en el cultivo con una densidad de flujo de fotones de  $1500 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  usando carbono inorgánico (92.76%) véase figura 19(A). Para *Dunaliella sp.* el valor de remoción más alto se dio en el cultivo usando una densidad de flujo fotónico de  $1500 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico (86.62%) véase figura 19(B). Y para *Nannochloropsis sp.* el valor de remoción más alto se dio en el cultivo con  $1500 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con carbono inorgánico (80.75%) véase figura 19(C). Los valores obtenidos fueron más altos que los reportados (54% de remoción de materia orgánica disuelta) para clorofitas por Chacón, (2004).

En la tabla 8 se muestra las remociones por especie y condiciones de cultivo.

**Tabla 8.** Remoción de nutrientes de *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

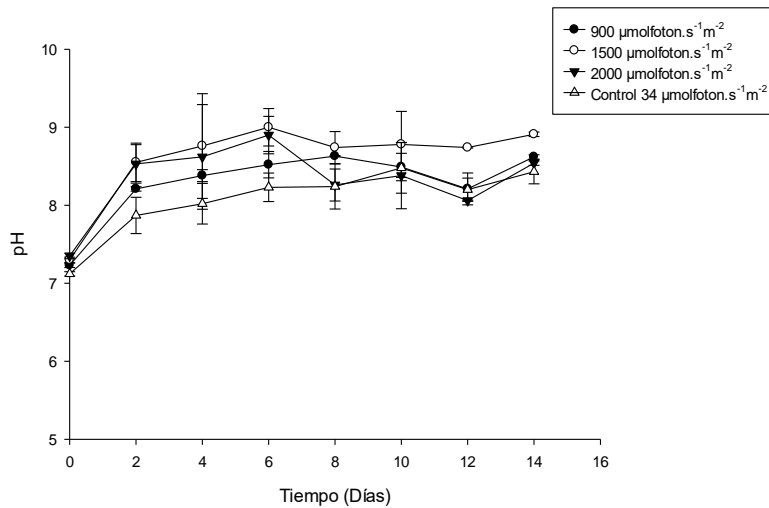
<i>Tetraselmis sp.</i>						
	C.O 900	C.O. 1500	C.O 2000	C.I. 900	C.I. 1500	C.I. 2000
<b>%Remoción</b>						
<b>Nitrato</b>	90.16	98.68	99.26	58.93	88.94	50.60
<b>Nitrito</b>	81.41	69.26	68.96	83.78	84.28	87.84
<b>Amonio</b>	92.97	99.15	99.77	80.21	77.14	57.71
<b>Ortofosfatos</b>	85.73	65.93	66.59	73.11	94.84	53.51
<b>DQO</b>	89.96	90.15	86.09	87.77	92.76	81.80
<i>Dunaliella sp</i>						
<b>Nitrato</b>	87.97	69.34	97.21	99.03	90.38	93.94
<b>Nitrito</b>	74.39	35.20	99.52	90.14	97.89	88.6
<b>Amonio</b>	74.69	64.72	78.03	86.81	95.78	96.22
<b>Ortofosfatos</b>	58.60	61.09	43.20	88.30	89.13	86.39
<b>DQO</b>	75.67	79.26	73.12	61.95	86.62	78.84
<i>Nannochloropsis sp</i>						
<b>Nitrato</b>	76.48	58.04	96.86	98.79	99.35	99.84
<b>Nitrito</b>	90.83	91.97	97.24	97.04	98.31	99.58
<b>Amonio</b>	80.46	88.69	91.10	88.66	94.48	99.95
<b>Ortofosfatos</b>	93.44	88.22	91.90	86.62	89.43	97.13
<b>DQO</b>	56.67	74.54	72.27	63.27	80.75	71.13

### 5.6 Segunda Experimento: Cultivo de *Tetraselmis sp.* en medio con carbono inorgánico.

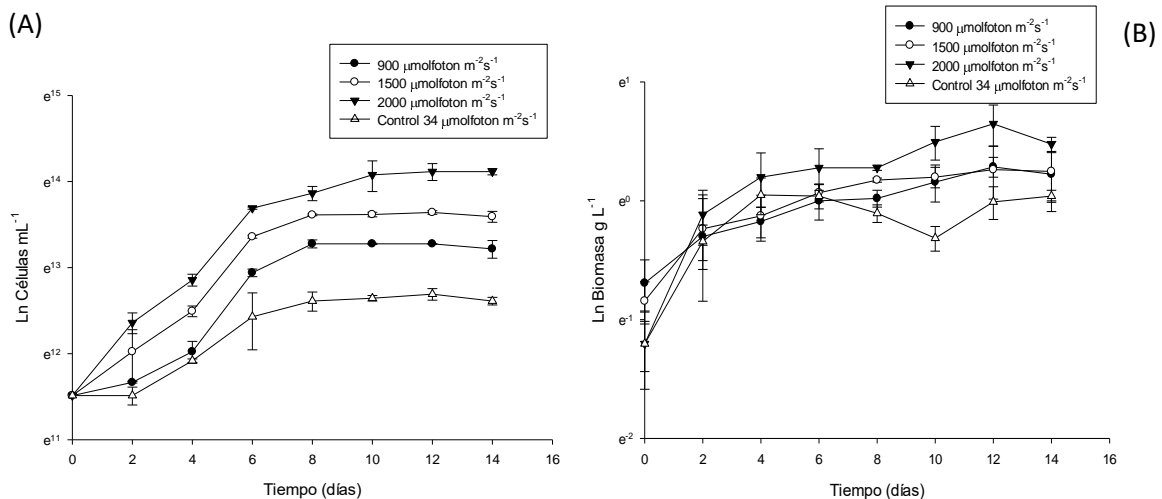
Los resultados obtenidos en el análisis anterior indicaron que la especie de microalga marina con mejor productividad ( $31.25 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) de lípidos es *Tetraselmis sp.* cultivado en un medio con carbono inorgánico al obtener una producción de  $151.5 \pm 31 \text{ mg L}^{-1}$ . Al igual que en la primera fase del proyecto, se evaluaron la producción de lípidos, producción de biomasa, producción de clorofila, la remoción de nutrientes, perfil de materia orgánica disuelta mediada como demanda química de oxígeno (DQO) y perfil de ácidos grasos por análisis de cromatografía de gases.

### 5.6.1. Cultivo y crecimiento de *Tetraselmis sp.* en el segundo experimento

La temperatura de cultivo fue de  $28^{\circ}\text{C}\pm 1.5$ . El pH también se midió una vez al día durante la duración del cultivo (16 días). Los valores iniciales fueron los siguientes: 900=7.23, 1500=7.3, 2000=7.35 y C=7.12., siendo similar al pH de 7.1 reportado por Silva *et al.*, (2011) para *Tetraselmis sp.* El comportamiento del pH durante el cultivo se muestra en la figura 20.



**Figura 20.** Variación del pH en los cultivos con *Tetraselmis sp* (std=3)



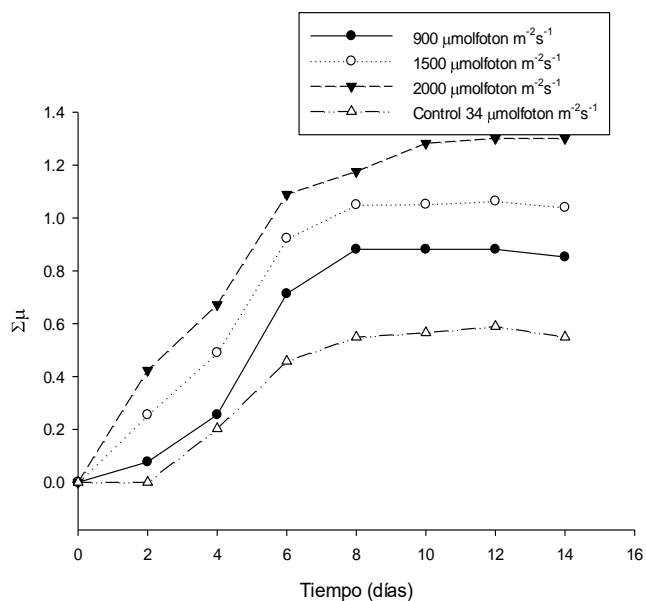


**Figura 21.** Conteo celular (A) y peso seco *Tetraselmis sp* (B) (std=3)

El conteo por cámara de Neubauer dio como resultado que el cultivo que dio mayor cantidad de células es el obtenido en 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones ( $1.35 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  siendo un valor menor al  $1.42 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  reportado para *Tetraselmis sp.* cultivado en agua residual de trucha arcoíris por Zare y Jairo, 2018) mientras que el grupo control fue el que produjo menos cantidad de células ( $3.25 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) véase figura 21(A). El análisis de varianza ANOVA dio como resultado que existe diferencia significativa entre la cantidad de células por cultivo. El análisis de la prueba de Tukey dio como resultado que existen diferencias significativas entre el cultivo usando 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y el grupo control ( $34 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

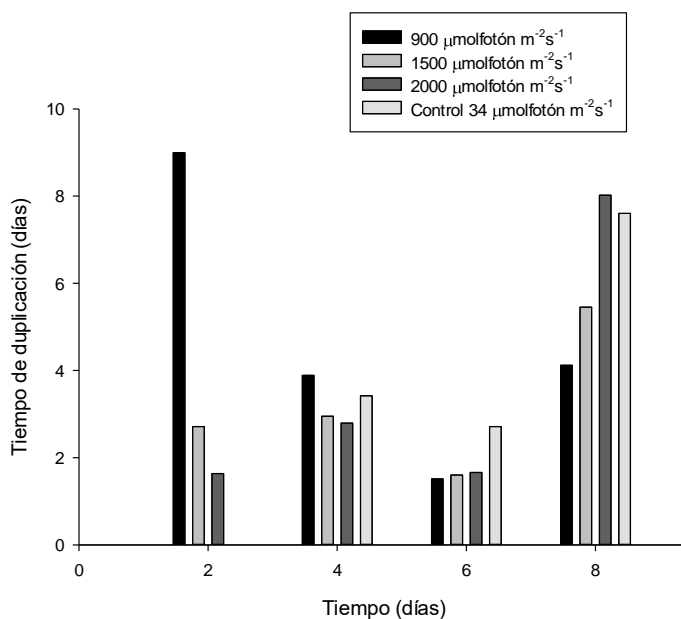
Para peso seco véase figura 21(B) *Tetraselmis sp.* a una densidad de flujo fotónico de 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  produjo el valor más alto de biomasa el día 12 ( $1.91 \pm 0.3$  g  $\text{L}^{-1}$ , siendo menor al valor de 3.30 g  $\text{L}^{-1}$  en condición de estrés reportado para *Chlorella vulgaris* por Wai Yan *et al.*, 2018) y la mayor productividad de biomasa ( $115 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). La mayor tasa de crecimiento se produjo en 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $0.3017 \text{ d}^{-1}$ ) así como el tiempo de generación más bajo (2.297 d). El análisis ANOVA dio como resultado que no hay diferencias significativas entre cultivos con distintas condiciones de densidad de flujo de fotones.

La sumatoria de la tasa de crecimiento nos indica que la fase Lag ocurre los días 0 al 2, después la fase de aceleramiento ocurre 2 al 4 en todos los cultivos. La fase exponencial se observa entre los días 4 al 6, la fase de desaceleración del 6 al 8, siendo la fase estacionaria del 8 al 12 para después el inicio de la fase de muerte el día 14. La tasa de crecimiento para 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fue de  $0.3017 \text{ d}^{-1}$ , para 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fue de  $0.2768 \text{ d}^{-1}$ , para 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fue de  $0.24 \text{ d}^{-1}$  y para el grupo control ( $34 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) fue de  $0.1557 \text{ d}^{-1}$  véase figura 22.



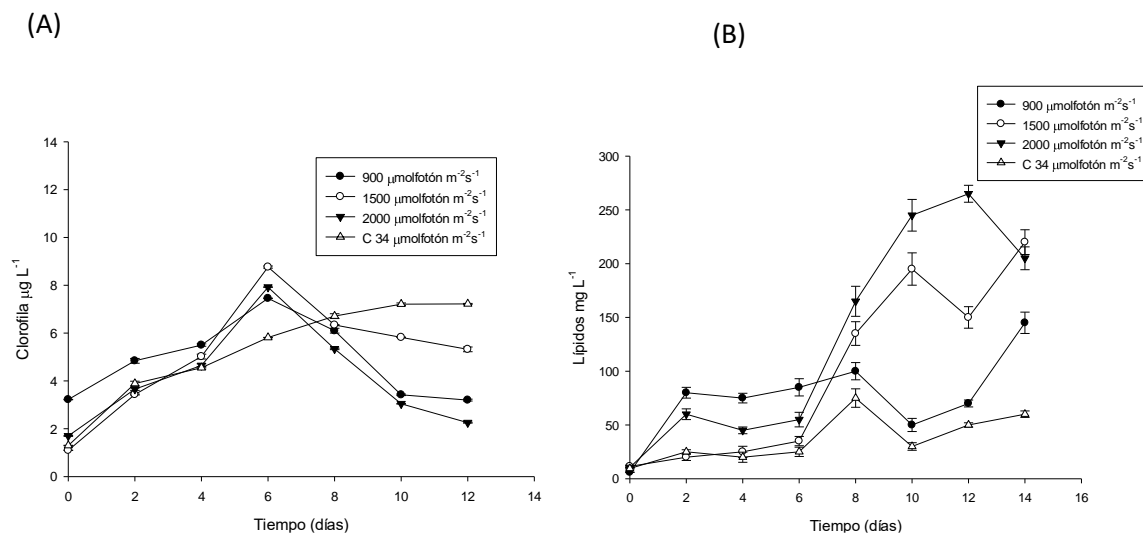
**Figura 22.** Cinética de crecimiento mediante la sumatoria de tasas de crecimiento de *Tetraselmis sp* (std=3).

El análisis de parámetro poblacional de tiempo de duplicación dio como resultado que para duplicar la población de cada uno de los cultivos se necesitó: 900 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> = 1.51 d en el día 6, 1500 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> = 1.60 d en el día 6, 2000 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> = 1.63 d en el día 2 y el grupo control = 2.71 d en el día 6 véase figura 23.



**Figura 23.** Tiempo de generación de *Tetraselmis sp* (std=3).

## 5.7 Producción de lípidos, clorofila y biomasa con *Tetraselmis sp.*

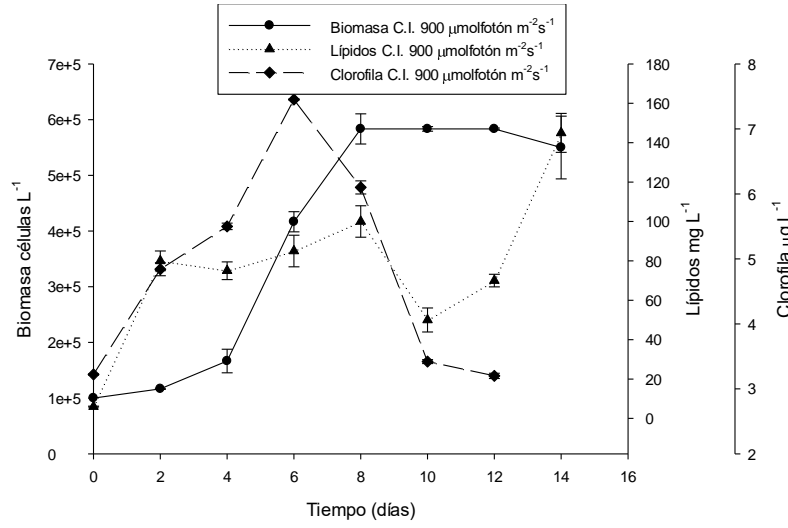


**Figura 24.** Producción de clorofila (A) y lípidos (B) para *Tetraselmis sp* (std=3).

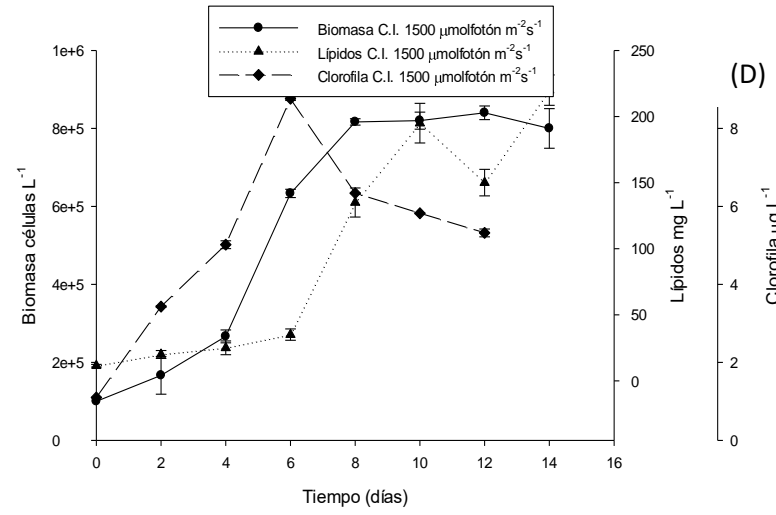
*Tetraselmis sp.* a una densidad de flujo fotónico de  $2000 \mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtuvo el valor más alto de lípidos totales el día 12 véase figura 24(B) ( $265 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo este valor el más alto de todas las determinaciones y siendo mayor a los valores reportados en la producción de lípidos en efluentes de aguas residuales industriales :133.6 a  $140.9 \text{ mg L}^{-1}$  por Ferrer, 2010) y la mayor productividad de lípidos totales ( $34.64 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) mientras que la mayor proporción de lípidos/peso seco (62.06%) fue para la densidad de flujo fotónico de  $900 \mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Para la producción de clorofila véase figura 24(A) la condición que tuvo el valor más alto de clorofila el día 6 ( $8.761 \pm 0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y la mejor productividad ( $0.796 \mu\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) fue usando  $1500 \mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (estando dentro del intervalo de 9.2 a  $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$  reportado por Cáceres, 2009). Para la producción de lípidos y clorofila se realizó un análisis de varianza ANOVA véase Anexo y no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de cultivo con diferentes densidades de flujo de fotones. La relación biomasa, clorofila y lípidos tiene una tendencia similar en los cultivos con 900, 1500, 2000 y  $34 \mu\text{molfoton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  véase figura 25, donde los lípidos aumentan después de la fase de muerte (días 12) y la baja en la producción de clorofila (día 6 a 8).

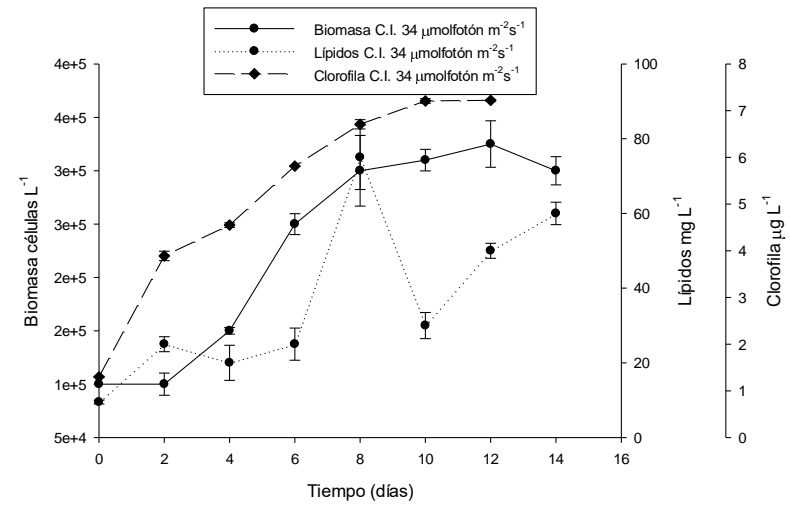
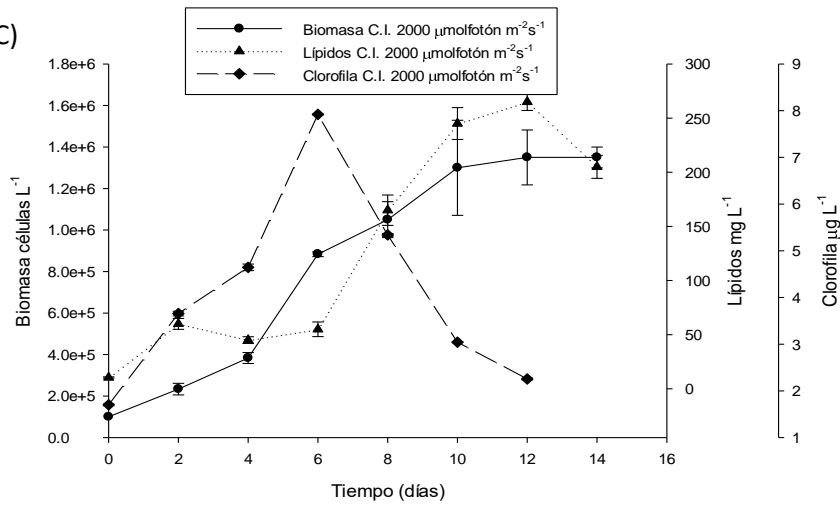
(A)



(B)



(C)



**Figura 25.** Producción de Biomasa, lípidos y clorofila con *Tetraselmis sp.* (A) 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (B) 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (C) 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ , (D) Control 34  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{C.I.}$ (std=3).

**Tabla 9.** Productividades *Tetraselmis sp* segundo experimento.

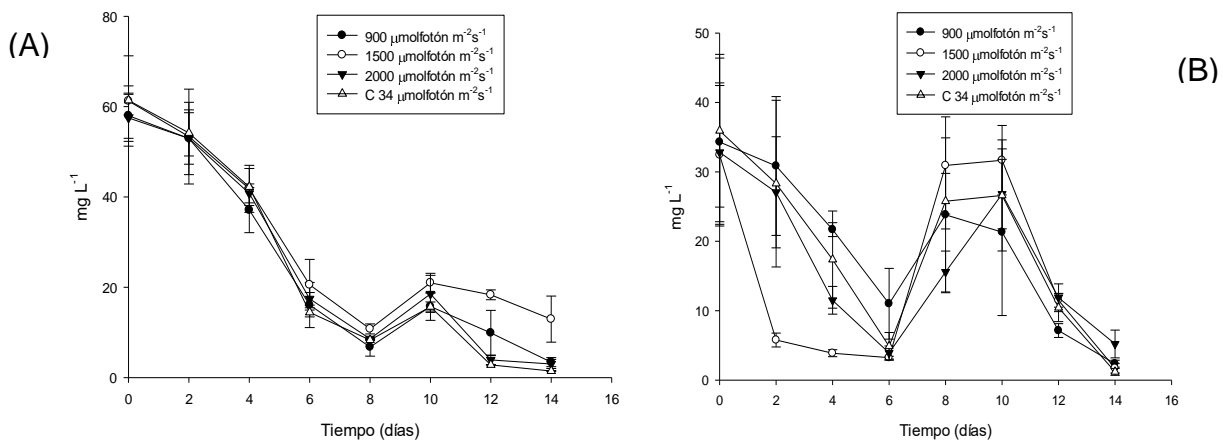
<i>Tetraselmis sp.</i>				
Densidad de flujo fotónico ( $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	900	1500	2000	34 (control)
Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.33±0.2	1.3±0.1	1.91±0.3	1.05±0.1
Tasa de crecimiento ( $\text{d}^{-1}$ )	0.3017	0.2768	0.24	0.1557
Tiempo de generación (d)	2.297	2.504	2.888	4.451
Productividad biomasa ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	89.28	91.42	115	74.28
Lípidos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	145±10	220±15	265±11	75±5
Productividad lípidos ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	31.78	28.57	34.64	26.78
Proporción lípidos/peso seco (%)	62.06	58.18	60.75	36.66
Clorofila ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	7.453±0.1	8.761±0.2	7.921±0.1	7.223±0.9
Productividad clorofila ( $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	0.677	0.796	0.72	0.528

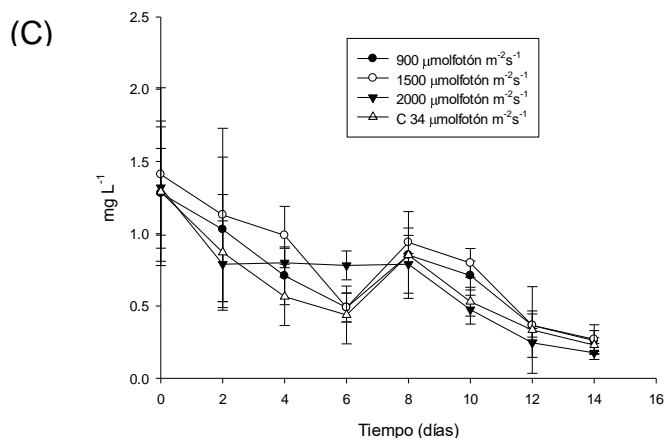
## 5.8 Remoción de nutrientes con *Tetraselmis sp.*

### 5.8.1. Remoción de nitrógeno con *Tetraselmis sp.*

En este análisis se obtuvo la remoción del nitrógeno inorgánico (nitrato y nitrito) y del nitrógeno amoniacal.

El comportamiento de ambos tipos de nitrógeno se describe a continuación.





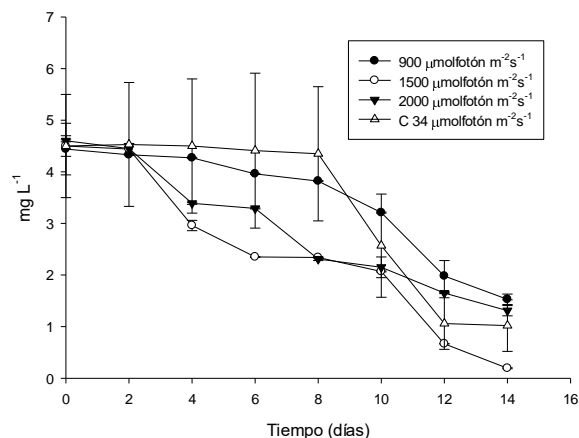
**Figura 26.** Remoción nitrógeno con *Tetraselmis sp.*: (A) Amonio, (B) nitrato y (C) nitrito (std=3).

El mayor % de remoción de amonio véase *figura 26(A)* ocurrió en el grupo control (97.62%), estando dentro del rango descrito por Zaballa *et al.*, 2016 de 64-75% para chlorophytas. El nitrato se removió al 96.68% véase *figura 26(B)* en el grupo control y nitrito véase *figura 26(C)* se removió en 2000  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  86.66%.

En los cultivos hubo remineralización por biomasa muerta, por lo que se observa un aumento en la concentración el día 8-10, para después decaer. La remoción de nitrato y nitrito es mayor a la obtenido por Wai Yan *et al.*, (2018), siendo para nitratos y nitritos de 47.08% y 51.21% respectivamente.

### 5.8.2 Remoción de ortofósforos con *Tetraselmis sp.*

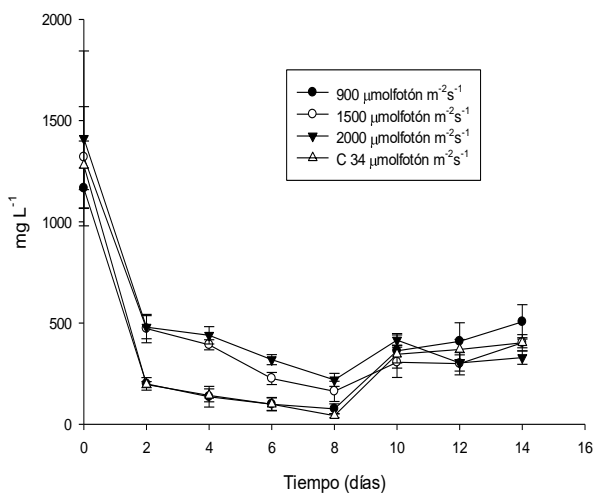
La remoción de fósforo tanto en los cultivos que usaron fuente de carbono acetato de sodio y los controles que usaron  $\text{CO}_2$  se describe en la figura 27.



**Figura 27.** Remoción de ortofosfatos con *Tetraselmis sp.*(std=3).

La mayor remoción de ortofosfatos se dio en 1500  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (95.68%)siendo mayor al 30.77% reportado para tratamiento de aguas de la industrial del aceite de palma usando *Chlorella vulgaris* por Wai Yan *et al.*, (2018).

### 5.8.3. Determinación de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO) para cultivo de *Tetraselmis sp.*



**Figura 28.** Perfil de contenido de materia orgánica disuelta medido como DQO para cultivo de *Tetraselmis sp.* (std=3).

En la gráfica véase figura 28 se puede observar que hay una disminución gradual en la materia orgánica disuelta presentada como demanda química de oxígeno relacionada al aumento de biomasa. El mayor valor de remoción de materia orgánica disuelta se dio en 2000  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  el día 8 del cultivo, siendo de 76.67, siendo una un porcentaje de remoción mayor al 47.09% reportado en efluentes de producción de aceite de palma y tratados con *Chlorella vulgaris* (Wai Yan *et al.*, 2018)

En la tabla 10 se puede observar un resumen del mayor valor de porcentaje de remoción por cultivo a distinta densidad de flujo de fotones.

**Tabla 10.** Porcentaje de remoción más altos de *Tetraselmis sp.* a cuatro distintas densidades de flujo de fotones.

<i>Tetraselmis sp.</i>				
%Remoción	900 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	1500 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2000 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Control 34 $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Nitrato	93.09	94.69	84.12	96.68
Nitrito	79.60	80.85	86.66	82.17
Amonio	94.08	78.85	94.74	97.62
Ortofosfatos	65.54	95.68	71.52	77.33
DQO	56.60	69.47	76.67	68.51

### 5.9 Extracción de lípidos

La cantidad de lípidos extraídos fueron los siguientes: 900  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  = 0.1715 g de lípidos  $\text{L}^{-1}$ , 1500  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  = 0.1860 g de lípidos  $\text{L}^{-1}$ , 2000  $\mu\text{molfotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  = 0.2385 g de lípidos  $\text{L}^{-1}$ ., Control= 0.4322 g de lípidos  $\text{L}^{-1}$ .



### 5.10 Análisis cromatográfico.

Los resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos se describen a continuación en la tabla 11 y 12.

**Tabla 11.** Concentración de ácidos grasos para *Tetraselmis sp.* obtenido en GC-MS del CIBNOR.

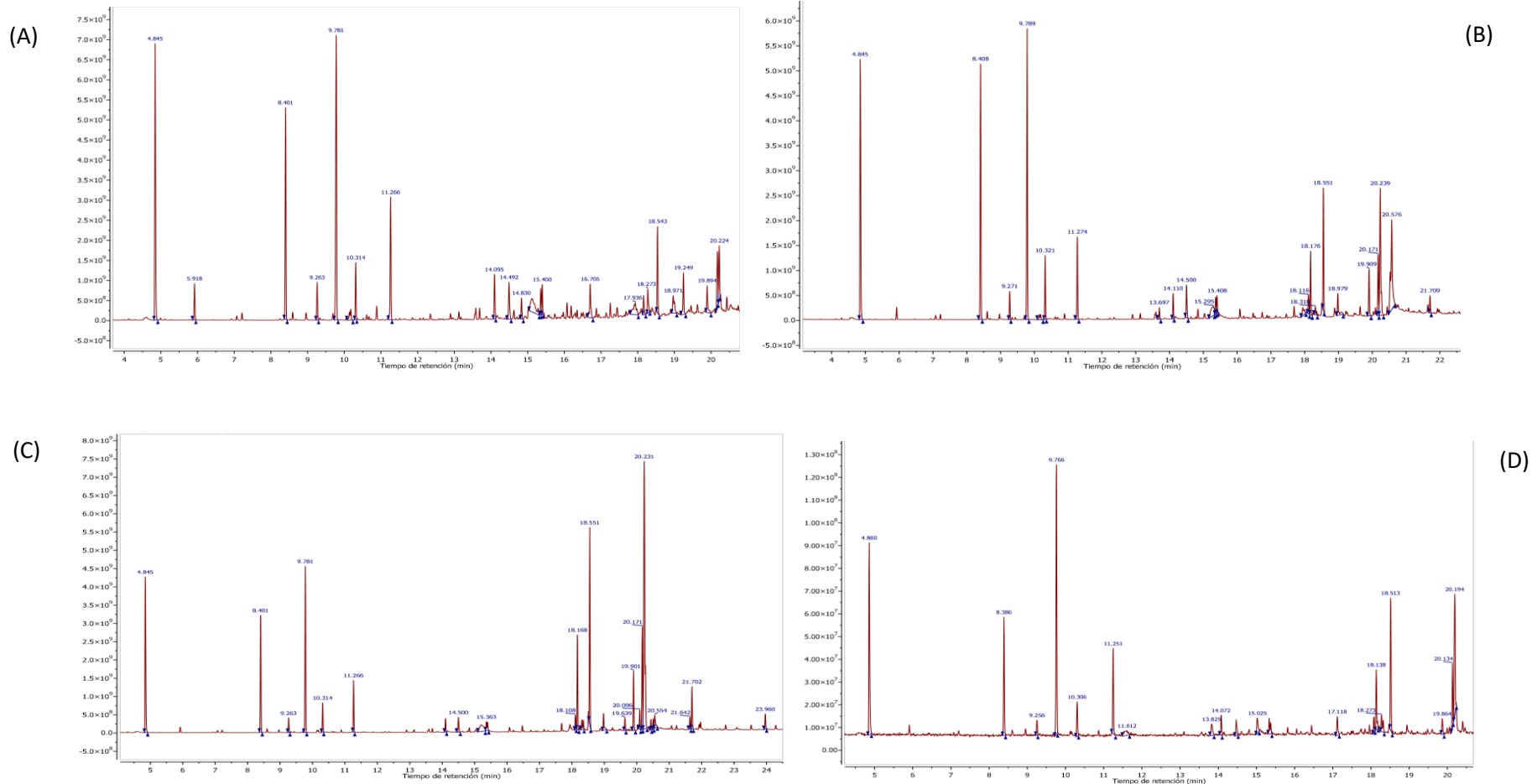
FAME	Concentración ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) <i>Tetraselmis sp.</i>			
	Control 34 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	900 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	1500 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$	2000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<b>16:0</b>	0.2834	16.00	29.22	45.60
<b>16:1<math>\omega</math>9</b>	0.0707	0.522	0.695	1.686
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	0.0667	0.424	1.147	1.012
<b>16:2<math>\omega</math>6</b>	0.1022	1.715	2.376	3.739
<b>16:2<math>\omega</math>4</b>	0.0156	0.343	0.266	0.668
<b>16:3<math>\omega</math>6</b>	0.0057	0.176	0.372	0.517
<b>16:3<math>\omega</math>3</b>	0.0481	2.703	0.971	4.618
<b>16:4<math>\omega</math>3</b>	0.0712	7.480	7.183	13.13
<b>18:0</b>	0.0492	0.198	1.286	1.543
<b>18:1<math>\omega</math>9</b>	0.1352	4.655	27.76	13.66
<b>18:1<math>\omega</math>7</b>	0.0497	2.689	6.907	5.770
<b>18:2<math>\omega</math>6</b>	0.1014	8.033	12.05	15.45
<b>18:3<math>\omega</math>6</b>	0.0241	0.504	0.301	0.549
<b>18:3<math>\omega</math>3</b>	0.2434	10.51	17.57	24.59
<b>18:4<math>\omega</math>3</b>	0.0403	0.238	0.896	1.050
<b>20:4<math>\omega</math>6</b>	0.0277	0.564	0.434	0.992
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	0.0380	0.805	1.244	0.996
<b><math>\Sigma</math> Ácidos grasos (<math>\mu\text{g mg}^{-1}</math>)</b>	1.373233	57.57407	110.7037	135.6017

**Tabla 12.** Porcentaje de ácidos grasos para *Tetraselmis sp.*

Metil ester	Estructura	%900 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$	%1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$	%2000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$	%34 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<b>Saturados totales</b>		16.32%	23.48%	32.98%	14.40%
<b>Ác. palmítico</b>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> (C16:0)	27.79%	26.39%	33.63%	20.63%
<b>Ác. esteárico</b>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> (C18:0)	1.138%	1.161%	3.585%	0.345%
<b>Monoinsaturados totales</b>		14.40%	32.98%	16.32%	23.48%
<b>Ác. oléico</b>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> (C18:1)	8.085%	25.08%	10.07%	9.850%
<b>Poliinsaturados totales</b>		47.50%	37.94%	47.43%	55.08%
<b>Ác. linoleico</b>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> (C18:2)	10.88%	11.39%	13.95%	7.384%
<b>Ác. linolenico</b>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> (C18:3)	17.29%	18.14%	18.26%	15.87%

Los resultados obtenidos en el laboratorio del CIBNOR véase *figura 29* arrojaron que la condición en la que se produce mayor cantidad de ácidos grasos fue 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (135.60 mg) seguido de 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (110.70 mg), 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (57.57 mg) y el grupo control (1.371 mg). En el cultivo con 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se obtuvo la mayor concentración de 16:0 (ácido palmítico) = 5.60  $\mu\text{g mg}^{-1}$  y para 18:3 $\omega$ 3 (ácido  $\alpha$ -linolenico) = 24.59  $\mu\text{g mg}^{-1}$ . Mientras tanto se obtuvo que las concentraciones más bajas de ácidos grasos se observan en el grupo control (34  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), siendo esto indicativo de que al aumentar la concentración de densidad de flujo de fotones aumenta la cantidad de ácidos grasos en el cultivo de microalgas, siendo de importancia esto ya que estos ácidos grasos son materias primas para la aditivos alimenticios así como aceites y precursores para biodiesel (16:0), siendo 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la condición a la cual se produjo una mayor cantidad de ácidos grasos de las siguientes moléculas: 16:0= 45.60  $\mu\text{g mg}^{-1}$  y 18:3 $\omega$ 3= 24.59  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , siendo 16:0 útil para la producción de biodiesel, como aditivo para cosmetología y aditivo alimenticio y 18:3 $\omega$ 3 es usado como nutraceutico y saborizante natural. La composición de *Tetraselmis suecica* por Soto-León *et al.*,

(2014) observada fue: palmitico 28.86; estearico 28.33; oleico 16.79; linoleico 11.71 y linolenico 14.31%, siendo semejante a lo reportado en este proyecto, excepto en los valores del ácido esteárico, donde Soto-León reporta valores mayores a los observados en este estudio véase *tabla 12*. Mientras que Tanzi *et al.*, (2013) trabajaron con *Nannochloropsis oculata* y *Dunaliella salina* y reportaron un perfil de ácidos grasos que coincide cualitativamente con los resultados aquí presentados, excepto que en sus trabajos solo encontraron trazas de C18:0. Por otra parte, Bondioli *et al.*, (2012) obtuvieron un 18.94% de poliinsaturados y un 46.98% en monoinsaturados en *Tetraselmis suecica* a diferencia de los 55.08% a 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para ácidos grasos poliinsaturados y los 32.98% a 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para monoinsaturados.



**Figura 29.** Cromatograma muestra (A) 900  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , (B) 1500  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (C) 2000  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (D) Control.

# **CAPÍTULO 6**

## **Conclusiones**

## 6. Conclusiones.

Los resultados obtenidos durante este proyecto permiten concluir que la producción de lípidos y clorofila se vieron afectadas por la densidad de flujo de fotones, siendo que en los valores más altos de 1500 y 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se obtuvieron las producciones de lípidos, biomasa y clorofila más altas (estos valores fueron iguales o más altos a los reportados en producción de lípidos y clorofila en estrés en la bibliografía para las especies estudiadas). Se pudo observar una relación de biomasa, clorofila y lípidos que siguieron una tendencia, aumentando la producción de lípidos mientras que la producción de biomasa y clorofila descendieron durante la etapa de estrés por detrimento de nutrientes, condición que aumenta la producción de lípidos. También existen variaciones en la producción de lípidos, clorofila y biomasa dependiendo de la especie y la fuente de carbono en la cual se cultivaron: *Nannochloropsis sp.* con carbono inorgánico produjo la mayor cantidad de biomasa, *Tetraselmis sp.* con carbono inorgánico fue la especie que produjo el valor más alto de lípidos. Los valores más altos de producción de clorofila en todos los cultivos que usaron el acetato de sodio, siendo *Dunaliella sp.* la especie que obtuvo el valor más alto de clorofila. Es importante conocer la cantidad de lípidos y clorofila producidos para diseñar biorreactores y procesos donde se tomen en cuenta las condiciones de cultivo, fuente de carbono para el cultivo, especie y fase de crecimiento en donde se puede obtener una mayor productividad del producto de valor agregado que se desea obtener (ya sea lípidos o clorofila, ambos muy cotizados en la industria alimentaria como nutraceuticos y bioenergéticos). La remoción de los compuestos de nitrógeno es alta, así como la remoción de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno y ortofosfatos, estos últimos llegando a 95% en 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , siendo valores muy buenos de remoción, lo que demuestra la utilidad de *Tetraselmis sp.* *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* para su uso como tratamiento biológico de aguas residuales provenientes de la acuicultura. El perfil de ácidos grasos de *Tetraselmis sp.*, a 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  dio como resultado la presencia de ácidos grasos usados como materia prima para la producción de biodiesel, la industria alimentaria y cosmética.

# **CAPÍTULO 7**

## **Perspectivas**

## 7. Perspectivas.

-Realizar un estudio de actividad enzimática en las rutas metabólicas de producción de lípidos y clorofila durante estrés por detrimento de nutrientes, a diferentes condiciones de densidad de flujo de fotones y distintas fuentes de carbono para *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.*

-Usar otro tipo de agua residual de alto impacto en México como medio de cultivo. Para esto se propone usar agua residual real y sintética de la industria del mezcal y tequila (vinazas) para determinar la viabilidad de uso de las microalgas como un tratamiento biológico terciario para remoción de nutrientes y contaminantes.

-Determinar la producción de productos de valor agregado, como lo son pigmentos ( $\beta$ -carotenos y astaxantinas) durante estrés por detrimento de nutrientes y a diferentes condiciones de cultivo.

-Se plantea el cultivo e investigación futuro de especies emergentes de microalgas para producción de productos de valor agregado y tratamiento de aguas residuales.



## **8.Referencias.**

## 8. REFERENCIAS.

Abdelaziz, E., Leite B.G. y Hallenbeck, C.P. (2013). Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuel: I. Algal strain and nutrient supply. *Environmental Technology* 34: 1783-1805 pp.

Aldesanya, V.O., Davey, M.P., Scott, S.A. y Smith, A.G. (2014). Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresources technology*. 157:293-304 pp.

Ami Ben, C. y Mordhay, A. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *TIBTECH*. MAY: 121-125 pp.

Amna Kashif, S., Hwang, Y.J. y Park, J.K. (2018). Potent biomedical applications of isolated polysaccharides from marine microalgae *Tetraselmis* species. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 41(11): 1-2 pp.

APHA (American Public Health Association) (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *American Public Health Association, American Water Works*. 20th Edition: 1090-1100 pp.

Arredondo, B.O. y Vázquez-Duhalt, R. (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111pp.

Arredondo, B.O., Voltolina, D., Savín Zenteno, T., Montoya Arce, M. y Anduro Gómez, A.G. (2017). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *CONACYT CIBNOR*. 2da Edición, 93-120 pp.

Australian Bureau of Statistics (1995). *National nutrition survey, foods eaten, Australia* 4804.0.

Bastidas, O. (2012). Conteo Celular con Hematocitómetro. Uso Elemental del Hematocitómetro. Nota técnica. *Celometrics*. 6 p.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37:911-917 pp.

Boey, P., Maniam, G. y Hamid, S. (2009). Biodiesel from Adsorbed Waste Oil on Spent Bleaching Clay using CaO as a Heterogeneous Catalyst. *European Journal of Scientific Research*. Volumen 33 no. 2.

Bondioli, P., Della-Bella, L., Rivolta, G., ChiniZittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiamonti, D. y Tredici, M.R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F& M-M33. *Bioresource Technology*. 114, 567-572 pp.

Borowitzka, M.A. (1988). Fats, oils and hydrocarbons. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. PP. 257-287 pp.

Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y. y Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*. 12, 37-47 pp.

Caceres Cuellar, S.O. (2009). Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante. *Universidad de Chile*. Pag 31-40 pp.

- Cai, T., Park, S.Y. y Li, Y. (2013). Nutrient recovery from waste water stream by microalgae: status and prospects, renew sustain. *Energy review*. 19:360-369 pp.
- Canakci, M. y Sanli, H. (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35(5):431-441 pp.
- Cañavate, J.P., Armada, I. y Hachero-Cruzado, I. (2017). Polar lipids Analysis of cultured phytoplankton reveals significant inter-taxa changes, low influence of growth stage, and usefulness in chemotaxonomy. *Microbial Ecology*. 73:755–774 pp.
- Carreón-Palau, L. J., Del Angel-Rodríguez, A. y Arjona-López, M. O. (2007). Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases espectrometría de masas en: Métodos analíticos para la evaluación de la biomasa microalgas. *CIBNOR*. 97 p.
- Castillo, O.S., Torres-Badajoz, C., Núñez-Colín, A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez. C.H. y Rodríguez-Núñez, J.R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*. 27 (3): 337-352 pp.
- Cerón García, M.C. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudio agroalimentarios*. 2173:87-105 pp.
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. y Morales, E. (2004). Uso de *Chorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fosforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín de investigaciones biológicas*. 38: pp. 94-108 pp.
- Chini Zittelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M. y Tredici, M.R. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*. 70:299–312 pp.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306 pp.
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H. y Lin, C.S. (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*. 100(2):833-838 pp.
- Cohen, Z. (1986). Products from microalgae. In: Handbook of microalgal mass culture. *Richmond A.* (ed.) *CRC Press*. 421-454 pp.
- Costa, S.S., Miranda, L. A., Andrade, B. B., Assis, J.D., Spuza, C.O., Morais, G.M., Costa, V.J.A. y Druzian, I.J. (2018). Influence of nitrogen growth, biomass composition, production and properties of polyhydroxyalkanoates (PHA) by microalgae. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116:552-562 pp.
- Cottet, M.J. (1965). Dosage des lipides sériques par la méthode sulfo-phosphovanillique (1) de E Chabrol et R. Charonnat. *Académie National de Médecine*. 149: 331-338 pp.
- Cuellar-Bermudez, S.P., Garcia-Perez, J.S., Rittman, B.E. y Parras-Saldivar, R. (2014). Photosynthetic Bioenergy CO<sub>2</sub>: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*. 1-13 pp.
- Dean, A.P, Sigeo, D.C., Estrada, B. y Pittman, J.K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*. 101: 4499–4507 pp.

Del Angel-Rodríguez, J.A., Carreón-Palau, L. y Arjona-López, M. O. (2014). Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases espectrometría de masas en: Métodos analíticos para la evaluación de la biomasa microalgas. *Ediciones Pandora*. 152 p.

De la Vara, R. y Gutiérrez, H. (2015). Análisis y diseño de experimentos. *Mc Graw Hill Editorial, tercera edición*. 40-72 pp

Enamala, M.J., Enamala, S., Clavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhuyula, T.V., Veelpuri, J. y Kupamm, V. (2018). Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 94:49-68 pp.

Fawley, M.W., Jameson, I. y Fawley, K.P. (2015). The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*. Volume 54 (5):545–552 pp.

Ferrer G. (2010). Rendimiento en biomasa y contenido de lípidos de *Tetraselmis suecica* utilizando diferentes efluentes de bodegas de embarcaciones anchoveteras industriales en condiciones de laboratorio. *Universidad Nacional del Santa, Perú*. 10-23 pp.

Fidalgo, J.P., Cid, A. y Torres, E. (1998) Effects of nitrogen source and growth phase on proximate bio chemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 166: 105-116 pp.

Fischer, C.R., Klein-Marcuschamer, D. y Stephanopoulos, G. (2008). Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering*. 10: 295-304 pp.

Fogg, G.E. and Thake, B. (1987) *Algae Cultures and Phytoplankton*. *Ecology*. 3rd Edition, The University of Winsconsin Press, Ltd., London.

Fong Sing, S. (2014). Pilot scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of halotolerant *Tetraselmis* sp in raceway ponds under increasing salinity a novel protocol for comercial microalgal biomass production. *Bioresource Technology*. 161: 47-54 pp.

Francisco, E.C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E. y Franco, T. T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85: 395- 403 pp.

García, J., Mujeriego, R. y Hernandez-Mariné, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban waste water nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*. 12, 331-339 pp.

Gnansounou, E. y Raman, J.K. (2016). Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products. *Applied Energy*. 161. 300–308 pp.

González-Palma, C.A. (2018). Producción de lípidos usando un conglomerado de microalgas marinas. *Tesis de maestría en ciencias del mar y limnología, UNAM, laboratorio de microbiología experimental, Facultad de Química*. Pag 43.

Gomaa, A.S., Kholif, A.E., Kholif, A.M., Salama, R., El-Alamy, H.A., Olafadehan, O.A. (2018). Sunflower Oil and *Nannochloropsis Oculata* Microalgae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 66 (8): 1751-1759 pp.

Gouveia, L., Marques A. E., Lopes da Silva, T. y Reis, A. (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36:821-826 pp.

- Gouveia, L. y Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biodiesel production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36(2):269-274 pp.
- Grasshoff, K., Kremling, K. y Ehrhardt, M. (1999). *Methods of Seawater Analysis*. Wiley-VCH, 3ª edición, Alemania. 11:550-600 pp.
- Griffiths, M.J. y Harrison, S.T.L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*. 21(5):493-507 pp.
- Guillard, R.R.L. (1973). Division rates: Handbook of phycological methods. *Cambridge University press, Cambridge*. 289-312 pp.
- Hankey, G. J. y Jamrozik, K. (1996). Risk factors for stroke: lifestyle factors. *Cardiovascular Risk Factors*. (6): 5-17 pp.
- Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Del Pilar Sánchez Saavedra, M., Serrano Carreón, L. y Martínez Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. Vol. 13. 38-61 pp.
- Hu, H. y Gao, K. (2006). Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnology*. 28:987–992 pp.
- Hu, Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. y Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *The Plant Journal*. 54:621–639 pp.
- Humphrey, A.M. (1980). Chlorophyll. *Food Chemistry*. 5, 57–67 pp.
- Jiang, Junpeng, Yao, Changhong, Cao, Xupeng, Liu, Yinghui, Xue, Song. (2017). Characterization of starch phosphorylase from the marine green microalga (Chlorophyta) *Tetraselmis subcordiformis* reveals its potential role in starch biosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 10:1016 p.
- Jones j., Manning, S., Montoya, M., Keller, K. y Poenie, M. (2012). Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. *Journal of American Oil Chemist Society*. 89:1371–1381 pp.
- Kligerman, D.C. y Bouwer, E.J. (2015). Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 52:1834–1846 pp.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae a literature review. *Vatten*. 62: 31 p.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. y Lan, C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 81(4):629-636 pp.
- Li, W., Yu, Q., He, Z. (2014). Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy & Environmental Science*. 7: 911–924 pp.
- Liang, Y., Sarkany, N. y Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology*. 31:1043-1049 pp.
- Liu, B. y Zhao, Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 82: 775-780 pp.
- Loera-Quezada, M. M. y Olgún, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel :

- retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Y Algal*. 1: 91–116 pp.
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M. y Tanaka, T. (2018). Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Current opinion in Biotechnnology*. 50:111–120 pp.
- Mandal, S. y Mallick, N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*. 84(2):281-291 pp.
- Macías Martínez, M.R., Reyna Guadalupe, Sanchez Duarte, R.G., Meza Escalante, E.R., Ruth Gabriela Ullua Mercado, R.G. y Saldívar Cabrales, J. (2017). Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiesel. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33:85-91 pp.
- Matthew Posewit, C. (2017). Algal oil productivity gets a fat bonus. *Nature Biotechnology*. Vol. 35, 7 pp.
- Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R. y Tanaka, T. (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*. 15(2-3): 249-257 pp.
- Mazzuca-Sobczuka, T. y Chisti, Y. (2010). Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85:100-108 pp.
- Mclafferty, F. W. y Turecek, F. (1993). Interpretation of mass spectra. *University Sciences Books. Sausalito, CA*. 371 p.
- Mendoza, H., Molina Cedres, C., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K. y Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites*. 59(1):27-32 pp.
- Mohd, S. (2014). Kinetics and modeling of microalgae *Tetraselmis* sp. FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. (88) pp.30-41 pp.
- Molina Grima, E.; Sánchez Pérez, J. A.; García Camacho, F.; Fernández Sevilla, J. M.; Acién Fernández, F. G. y Urda Cardona, J. (1994). Biomass and eicosapentaenoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in an air-lift photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (42); pp. 658-663 pp.
- Msanne, J., Xub, D., Kondac, D., Casas-Mollanob, A., Awadaa, T., Cahoonc, d. y Ceruttib, H. (2011). Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*. 75: 50-59 pp.
- Muñoz, L. (2015). Remoción de amteria orgánica y nutrientes de aguas residuales. purines de cerdos y digestato anaerobio utilizando un consorcio de microalgas-bacterias. *Universidad Nacional Autonoma De México. Ciudad de México*. 23-28 pp.
- Muñoz, R. y Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial Process for the treatment for hazardous contaminants: a review. *Water research*. 40(15): 2799-2815 pp.
- Olivarría, D.F., Castillo, M.R.F., Murguía-López, A. y López, E.M. (2010). Crecimiento y biomasa de *Dunaliella* sp. cultivada en medios limitantes en nitrógeno. *Biotecnica*. (13) pp.58-66.
- Olmedo, F. (2009). Biodiésel de algas. Producción de biodiésel utilizando algas. *BiodiSol*. 7:33-45 pp.

- Perez-Hernandez, A., y Labbe, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. 49: 157-195 pp.
- Pohl, P. (1974). Control of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Unicellular Algae by the Nitrogen Content of the Nutrient Medium and by the Wavelength of Light. *Journal of American Oil Chemists Society*. (51); .521 p.
- Preetha K., John L., Subin CS. y Vijayan K.K. (2012). "Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity", : 10.1186-2046
- Raffat, A. (2011). Biodiesel Production Using Solid Metal Oxide Catalysis. *International Journal of Environment Science Technology* (en línea) Volumen 8 (número 1).
- Rawatl-Kumar, R.R., Mutanda, T. y Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*.88:3411–3424 pp.
- Reyimu, Z. y Ozcimen, D. (2017). Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater towards bioethanol production. *Journal of cleanead production*. 150: 40-46 pp.
- Rocha Beltrán, C.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 en química analítica ambiental). *Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León*. 54-66 pp.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. y Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*.102: 100-112 pp.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L. y Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19: 430-436 pp.
- Roynette, C. E.; Calder, P. C.; Dupertuis, Y. M. y Pichard, C. (2004). n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition*. 23: 139-151 pp.
- Sacristán de Alva, M., Luna Pabello, V.M., Cadena Martínez, E. y Alva Martínez, A.F (2014). Producción de biodiesel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*. 48:271-284 pp.
- Sacristán-de Alva, M., Luna-Pabello, V.M., Cadena, E. y Ortiz, E. (2013). Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 146: 744-748 pp.
- Sato, N. y Murata, N. (1988). Membrane Lipids. *Methods and Enzimology*. 167: 251-259 pp.
- Sajjadi, B., Chen, W.Y., Aziz, A., Raman, A. y Ibrahim, S. (2018). *Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97:200-232.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O. y Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 1:20–43 pp.

Schnetger, B. y Lehnert, C. (2014). Determination of nitrate plus nitrite in small volume marine water samples using vanadium (III) chloride as a reduction agent. *Marine Chemistry*. 160:91–98 pp.

SENER. Balance Nacional de Energía. (2013). México D.F. 234-255 pp.

Semopoulos, A.P. (1999). Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 60:421-429 pp.

Seo, T., Blaner, W. S. y Deckelbaum, R. J. (2005). Omega-3 fatty acids: molecular approaches to optimal biological outcomes. *Current Opinion in Lipidology*. 16:11-18 pp.

Shahidi, F. y Miraliakbari, H. (2004). Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part I- Cardiovascular disease and cancer. *Journal of Medicinal Food*. 7:387-401 pp.

Shin, Y.S., Choi, H.I., Choi, J.W., Lee, J.S., Sung, Y.J. y Sim, J.S. (2018). Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*. 258:335–344 pp.

Silva, B.J., Vásquez, V. Merino, M.F. (2011). Biomass production of *Tetraselmis suecica* using seawater with sanguaza. *Scientia Agropecuaria*. 2:13–23 pp.

Singh, V., Tiwari, A. y Das, M. (2016). Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae : A review. *Fuel*. 173:90–97 pp.

Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. y Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*. 20(3):245-251 pp

Soto-León, S., Patrón-Zauzeta, E.I., Váldez-Piña, P., Nieves-Soto, M., Moreno-Reyes, C. y Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 13, No. 3 :723-737 pp.

Soto Valencia, D.A. (2012). Capacidad de remoción de amonio y ortofosfato, a gran escala, de dos especies de microalgas, en aguas residuales municipales. *Universidad Autonoma Metropolitana*, México, D.F. 45-77 pp.

Spoehr, H.A y Milner, H.W. (1949). The chemical composition of *Chlorella*: Effect of environmental conditions. *Plant Physiology*. 24:120–149 pp.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. y Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2):87-96 pp.

Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K. y Yoshida, T. (2006). Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 54(1):112-117 pp.

Tanzi, C.D., Vian, M.A. y Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology*. 134: 271-275 pp.

Teo, C.L., Jamaluddin, H., Zain, N.A.M. y Idris, A. (2014). Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp. *Renewable Energy*. 68:1–5 pp.

Timberlake, C.F. y Henry, B.S. (1986). Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*. 10:31–36 pp.



Turmel, M., de Cambiaire, J.C., Otis, C. y Lemieux, C. (2016). Distinctive Architecture of the Chloroplast Genome in the Chlorodendrophycean Green Algae *Scherffelia dubia* and *Tetraselmis* sp. CCMP 881. *PLoS One*. 2:101-371 pp.

Vasudevan, P.T. y Briggs, M. (2008). Biodiesel production – current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35:421-430 pp.

Viêgas, C.V., Hachemi, I., Freitas, S.P., Mäki-Arvela, P., Aho, A., Hemming, J. y Murzin, D.Y. (2015). A route to produce renewable diesel from algae: Synthesis and characterization of biodiesel via in situ transesterification of *Chlorella* alga and its catalytic deoxygenation to renewable diesel. *Fuel*.155:144–154 pp.

Vyrides, I. y Stuckey, D.C. (2009). A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics. *Bioresource technology*. 100:979-982 pp.

Wai Yan, C., Pau Loke, C., Joon ching, J., Jo-Shu, C. y Tau Chuan, L. (2018). Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (POME) for lipid production and pollutants removal. *Energy Conversion and Management*. 174:430-438 pp.

Wang, J., Yang, H. y Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied of biochemistry and Biotechnology*. 172:3307-3329 pp.

Widjaja, A., Chien, C.C. y Ju, Y.H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineres*. 40(1):13-20 pp.

Wijffels, R.H. y Barbosa, M.J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*. 329:796-799 pp.

Xiong, W., Li X., Xiang, J. y Wu, Q. (2008). Highdensity fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 78(1):29-36 pp.

Zare, V. y Jairo, L. (2018). Uso de ensilado a base de residuos de trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como fertilizante orgánico para producción de microalga marina *Tetraselmis suecica*. *Universidad Nacional Agraria, Repositorio Institucional, Perú*.45-52 pp.

Zaballa, I.J., Zanon, M., Cuello, C., Gori, J.I., Vaccaro, R. y Ribaudó, C.M. (2016). Remoción biológica de nitrógeno y fósforo en aguas residuales por parte de microalgas y bacterias co-inmovilizadas. *Tercer encuentro de investigadores en formación de recursos hidráulicos IFRH*. 21-34 pp.

### 7.1 Referencias electrónicas.

CIA World Factbook (2009) [www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/](http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/) . Consultada el día 23 de Febrero del 2016.

Guiry, G.M. (2018). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/>; consultado el 30 de septiembre del 2018

<http://www.biodisol.com/biocombustibles/biodiesel-de-algas-proceso-de-produccion-de-biodiesel-utilizando-algas-energias-renovables-biocombustibles-cultivos-energeticos/>. Consultada el día 6 de Marzo del 2016.

<http://mcc.nies.go.jp/genusList.do?genus=Dunaliella>. Consultada el día 23 de Abril del 2016.

<http://mcc.nies.go.jp/genusList.do?genus=Nannochloropsis>. Consultada el día 23 de Abril del 2016.

<http://mcc.nies.go.jp/genusList.do?genus=Tetraselmis>. Consultada el día 24 de Abril del 2016.

<http://mcc.nies.go.jp/strainList.do?strainId=1707&strainNumberEn=NIES-1429>. Consultada el día 3 de Marzo del 2017.

# Anexo

## ANEXO: Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey.

Se realizó el análisis de varianza de un factor a 95% de confianza con  $p < 0.05$ , siendo la hipótesis nula que no hay diferencias significativas entre los promedios seleccionados y la hipótesis alterna es que existen diferencias significativas (en caso de que el valor de  $p$  sea menor a 0.05). Así mismo se realizó la prueba de Tukey HSD. Se usó la herramienta estadística de Excel versión 2016 para estos análisis. Para la prueba de Tukey se usaron las siguientes ecuaciones (De la Vara, 2015):

$$\text{Cuadrado del error medio (Mse)} = \frac{\Sigma \text{ de cuadrados}}{\text{Grados de libertad}}$$

$$\text{Diferencia honestamente significativa (HSD)} = (\text{Multi}) \left( \sqrt{\frac{\text{Mse}}{n}} \right)$$

Donde:

Multi= multiplicador de talbas segun interval de grados de libertad.

Mse= Cuadrado del error medio.

n= Tamaño del grupo por análisis.

### ***I-1 Analisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para biomasa. Lípidos y clorofila primera fase***

*Tabla anexo 1. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de biomasa Tetraselmis sp. Dunaliella sp. y Nannochloropsis sp. a 900  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$*

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.872	5	0.974	3.202	0.013	2.392
Dentro de los grupos	15.82	52	0.304			
Total	20.69	57				

HSD	0.625
Multi	3.4
Mse	0.304
n	9

PRUEBA DE TUKEY						
	T900 C.O.	T900 C.I.	D900 C.O.	D900 C.I.	N900 C.O.	N900 C.I.
T900 C.O.		A	B	A	A	A
T900 C.I.			C	C	C	D
D900 C.O.				E	E	E
D900 C.I.					E	E
N900 C.O.						F
N900 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

Tabla anexo 2. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de biomasa *Tetraselmis sp.* *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* a  $1500 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	10.00	5	2.001	5.987	0.0001	2.392
Dentro de los grupos	17.37	52	0.334			
Total	27.38	57				

HSD	0.65519706
Multi	3.4
Mse	0.334
n	9

	T1500 C.O.	T1500 C.I.	D1500 C.O.	D1500 C.I.	N1500 C.O.	N1500 C.I.
T1500 C.O.		A	B	A	A	B
T1500 C.I.			C	C	C	D
D1500 C.O.				E	E	F
D1500 C.I.					G	G
N1500 C.O.						I
N1500 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

Tabla anexo 3. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de biomasa *Tetraselmis sp.* *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* a  $2000 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6.151	5	1.231	3.823	0.0050	2.392
Dentro de los grupos	16.74	52	0.321			
Total	22.90	57				

HSD	0.643
Multi	3.4
Mse	0.321
n	9

	T2000 C.O.	T2000 C.I.	D2000 C.O.	D2000 C.I.	N2000 C.O.	N2000 C.I.
T2000 C.O.		A	B	A	A	B
T2000 C.I.			C	C	C	D
D2000 C.O.				E	E	F
D2000 C.I.					G	G
N2000 C.O.						I
N2000 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

Tabla anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de lípidos *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* a 900  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9933	5	1986	4.318	0.002	2.392
Dentro de los grupos	23922	52	460.0			
Total	33856	57				

HSD	24.30
Multi	3.4
Mse	460.0
n	9

	T900 C.O.	T900 C.I.	D900 C.O.	D900 C.I.	N900 C.O.	N900 C.I.
T900 C.O.		B	B	A	A	B
T900 C.I.			D	D	C	C
D900 C.O.				E	E	E
D900 C.I.					F	G
N900 C.O.						I
N900 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis sp.*, D=*Dunaliella sp.* y T=*Tetraselmis sp.*

Tabla anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de lípidos *Tetraselmis sp.*, *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* a 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	28907	5	5781	8.723	4.660E-06	2.392
Dentro de los grupos	34462	52	662.7			
Total	63369	57				

HSD	29.17
Multi	3.4
Mse	662.7
n	9

	T1500 C.O.	T1500 C.I.	D1500 C.O.	D1500 C.I.	N1500 C.O.	N1500 C.I.
T1500 C.O.		A	A	A	A	B
T1500 C.I.			C	C	D	D
D1500 C.O.				E	E	F
D1500 C.I.					G	H
N1500 C.O.						J
N1500 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis sp.* D= *Dunaliella sp.* y T= *Tetraselmis sp.*

Tabla anexo 6. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de lípidos *Tetraselmis sp.* *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis sp.* a 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	18169	5	3633	5.586	0.0003	2.392
Dentro de los grupos	33822	52	650.4			
Total	51992	57				

HSD	28.90
Multi	3.4
Mse	650.4
n	9



	T2000 C.O.	T2000 C.I.	D2000 C.O.	D2000 C.I.	N2000 C.O.	N2000 C.I.
T2000 C.O.		B	A	A	B	A
T2000 C.I.			D	D	C	D
D2000 C.O.				E	F	E
D2000 C.I.					H	G
N2000 C.O.						I
N2000 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis* sp. D= *Dunaliella* sp. y T= *Tetraselmis* sp.

Tabla anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de clorofila *Tetraselmis* sp. *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp. a 900  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	76.43	5	15.28	7.454	2.881E-05	2.404
Dentro de los grupos	100.4	49	2.050			
Total	176.9	54				

HSD	1.622
Multi	3.4
Mse	2.050
n	9

	T900 C.O.	T900 C.I.	D900 C.O.	D900 C.I.	N900 C.O.	N900 C.I.
T900 C.O.		A	B	A	A	A
T900 C.I.			D	C	C	C
D900 C.O.				F	F	F
D900 C.I.					G	G
N900 C.O.						I
N900 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis* sp. D= *Dunaliella* sp. y T= *Tetraselmis* sp.

Tabla anexo 8. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de clorofila *Tetraselmis* sp. *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp. a 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	162.7	5	32.54	14.18	1.606E-08	2.408
Dentro de los grupos	110.1	48	2.295			
Total	272.8	53				

HSD	1.716
Multi	3.4
Mse	2.295
n	9

	T1500 C.O.	T1500 C.I.	D1500 C.O.	D1500 C.I.	N1500 C.O.	N1500 C.I.
T1500 C.O.		A	B	A	A	A
T1500 C.I.			D	C	C	C
D1500 C.O.				F	F	F
D1500 C.I.					G	G
N1500 C.O.						I
N1500 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis* sp. D= *Dunaliella* sp. y T= *Tetraselmis* sp.

Tabla anexo 9. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de clorofila *Tetraselmis* sp. *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp. a 2000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	56.56	5	11.31	4.387	0.002	2.408
Dentro de los grupos	123.7	48	2.578			
Total	180.3	53				

HSD	1.81976725
Multi	3.4
Mse	2.57819858
n	9

	T2000 C.O.	T2000 C.I.	D2000 C.O.	D2000 C.I.	N2000 C.O.	N2000 C.I.
T2000 C.O.		A	B	A	A	A
T2000 C.I.			D	C	C	C
D2000 C.O.				F	F	F
D2000 C.I.					G	G
N2000 C.O.						I
N2000 C.I.						

Donde: N=*Nannochloropsis* sp. D= *Dunaliella* sp. y T= *Tetraselmis* sp.

**I-2 Analisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para biomasa, lípidos, y clorofila segunda fase.**

Tabla anexo 10. Análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para producción de células *Tetraselmis* sp

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.576E+12	3	5.2544E+11	4.870	0.007	2.946
Dentro de los grupos	3.020E+12	28	1.0789E+11			
Total	4.597E+12	31				

HSD	445939.2141
Multiplicador	3.84
Mse	1.07889E+11
n	8

	900	1500	2000	Control
900		A	A	A
1500			B	B
2000				D
Control				

Tabla anexo 11. Análisis de varianza (ANOVA) para producción de biomasa seca en *Tetraselmis sp.*

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.8883	3	0.29610741	2.367	0.089	2.901
Dentro de los grupos	4.002	32	0.1250			
Total	4.891	35				

\*NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Tabla anexo 12. Análisis de varianza (ANOVA) para producción de lípidos en *Tetraselmis sp.*

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1159	3	386.5	1.809	0.1682	2.946
Dentro de los grupos	5979	28	213.5			
Total	7139	31				

\*NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Tabla anexo 13. Análisis de varianza (ANOVA) para producción de clorofila en *Tetraselmis sp.*

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	7.943	3	2.647	0.764	0.5305	3.238	
Dentro de los grupos	55.43	16	3.464				
Total	63.37	19					

\*NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.