



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL Y SUBPRODUCTOS ÚTILES A PARTIR DEL TRATAMIENTO DE AGUA
QUE SIMULA UN EFLUENTE DE MARICULTURA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
MANUEL SACRISTÁN DE ALVA

TUTOR PRINCIPAL
Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO, FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
Dra. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
Dr. MODESTO JAVIER CRUZ GÓMEZ, FACULTAD DE QUÍMICA

CD.MX., NOVIEMBRE 2018



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: **Dra. Eugenia Judith Olguín Palacios**

Secretario: **Dr. Modesto Javier Cruz Gómez**

Vocal: **Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría**

1^{er.} Suplente: **Dra. María Teresa Orta Ledesma**

2^{o.} Suplente: **Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**

**Lugar donde se realizó la tesis: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
EXPERIMENTAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

TUTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

FIRMA

Agradecimientos

Se hace patente el apoyo recibido por el CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo, dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM.

Se agradece el apoyo económico otorgado por el Proyecto de la UNAM/DGAPA PAPIIT IT202818 “Desarrollo de una estrategia para el tratamiento de aguas residuales de maricultura empleando microalgas y aprovechamiento de la biomasa producida”

Al Doctor Víctor Manuel Luna Pabello por la dirección en la realización de esta tesis.

Al Doctor Modesto Javier Cruz Gómez por su apoyo en la realización de este trabajo y por sus consejos y orientación.

A la Doctora María Teresa Orta Ledesma por la revisión y comentarios hechos a este trabajo.

A la M. en C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán por la donación de las cepas de microalgas utilizadas en este trabajo.

A la M. en C. Korynthia López Aguiar por su apoyo durante la caracterización del agua residual.

A la Dra. Eugenia Judith Olguín Palacios por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría por la revisión de este trabajo, que han permitido mejorarlo.

Al M. en C. José Guadalupe de la Rosa Canales por su ayuda con el cromatógrafo de gases.

Dedicatorias

A Ayerim por su apoyo incondicional, su cariño y atención, por ser mi pareja de vida.

A Balam y Olín por ser parte de mi vida.

A mis padres por su apoyo.

A mi familia.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental: Ale, Sergio, Rafa, Edgar, Ana, Luis, Laura, Damián, Andrés, Carlos, Jorge, Andrés, Arturo, Luis III, Pao.

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Objetivo principal.....	5
Objetivos específicos.....	5
Hipótesis	5
Antecedentes.....	6
Sistemas de acuicultura	6
Cultivo de microalgas.....	12
Microalgas para tratamiento de aguas residuales provenientes de la acuicultura	13
Producción de biodiesel.....	14
Microalgas para la producción de biodiesel	15
Estrategias para aumentar la productividad de lípidos en las microalgas	16
Acumulación de lípidos en microalgas bajo condiciones de estrés.....	24
Producción de carbohidratos en microalgas para producción de bioetanol.....	27
Perspectivas de producción de biodiesel a partir de microalgas	31
Metodología.....	33
Diseño experimental.....	34
Cultivo de las microalgas	35
Determinaciones en el agua.....	35
Determinación de clorofila.....	36
Densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos	36
Selección de las microalgas.....	36

Agua residual sintética.....	37
Aclimatación de las microalgas al agua residual.....	37
Determinación del crecimiento de las microalgas.....	37
Determinación del contenido de lípidos.....	37
Tinción con Rojo Nilo.....	37
Separación de las microalgas del agua.....	38
Secado de la biomasa.....	38
Extracción de los lípidos de las microalgas.....	38
Producción de biodiesel.....	38
Calidad de lípidos y del biodiesel.....	38
Resultados y análisis.....	39
Caracterización del agua residual.....	39
Densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos (DFFFA).....	44
Cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp.	45
Cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.....	64
Cultivo de <i>Nannochloropsis</i> sp.	83
Comparación entre los cultivos de las 3 especies de microalgas.....	101
Porcentaje de lípidos en la biomasa seca de las tres microalgas cultivadas.....	107
Cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. en mayor volumen.....	108
Modelo conceptual de producción de lípidos bajo condiciones de estrés.....	117
Modelo de crecimiento en cultivo semicontinuo.....	120
Cosecha de la biomasa del medio de cultivo.....	122
Determinación de lípidos en la biomasa de <i>Tetraselmis</i> sp.....	124
Producción de biodiesel y caracterización.....	124
Determinación de carbohidratos en la biomasa de <i>Tetraselmis</i> sp.....	133

Conclusiones.....	134
Referencias	135
Anexo I. Descargas de aguas residuales en territorio mexicano	148
Anexo II. Nombre y estructura de los metil ésteres de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído de <i>Tetraselmis</i> sp.....	149

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones de contaminantes en efluentes de cultivo de camarón [25].	9
Tabla 2. Límites permisibles de descarga en los efluentes provenientes de la acuicultura según la Alianza Global de la Acuicultura (GAA) y la Corporación Internacional de Finanzas (IFC) [19].	11
Tabla 3. Productividades de biomasa y lípidos de diferentes especies de microalgas marinas.	18
Tabla 4. Caracterización de aguas residuales provenientes de diversos cultivos de organismos marinos en la Unidad Académica del Sisal de la Universidad Nacional Autónoma de México.	41
Tabla 5. Caracterización de aguas residuales del cultivo de camarón de la empresa Lamarca.	43
Tabla 6. DFFFA en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes horas del día (geoposicionamiento de la Unidad Académica del Sisal: 21°09'52.3"N 90°02'54.1"O).	44
Tabla 7. pH, oxígeno disuelto y temperatura de los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a diferentes DFFFA.	46
Tabla 8. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a diferentes DFFFA.	47
Tabla 9. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp- a diferentes DFFFA.	55
Tabla 10. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp.	56
Tabla 11. Contenido de clorofila en el medio de cultivo y en la biomasa de <i>Tetraselmis</i> sp.	63
Tabla 12. pH, oxígeno disuelto y temperatura de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a diferentes DFFFA.	65
Tabla 13. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a diferentes DFFFA.	66
Tabla 14. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp- a diferentes DFFFA.	73

Tabla 15. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp a diferentes DFFFA.	75
Tabla 16. Contenido de clorofila en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.	81
Tabla 17. pH, oxígeno disuelto y temperatura en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes DFFFA.	84
Tabla 18. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a diferentes DFFFA.	85
Tabla 19. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp- a diferentes DFFFA.	93
Tabla 20. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp.	95
Tabla 21. Comparación de cinéticas de remoción de nutrientes, productividades de biomasa y lípidos y tasas de crecimiento específico para las 3 especies de microalgas.	106
Tabla 22. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp.	107
Tabla 23. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.	107
Tabla 24. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp.	107
Tabla 25. Productividades de biomasa y lípidos, tasas de crecimiento específico y remoción de nutrientes en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp.	116
Tabla 26. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 62.	126
Tabla 27. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 63.	128
Tabla 28. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 64.	130
Tabla 29. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 65.	132

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de las etapas experimentales.	33
Figura 2. Afluente de la laguna 1 y 2 provenientes del cultivo de pulpo, camarón, especies de ornato, alimento vivo y peces marinos.	39
Figura 3. Afluente de la laguna 3 proveniente del cultivo de peces marinos.	39
Figura 4. Cultivo de anfípodos en biofloc.	40
Figura 5. Cultivo de camarón en bio-floc.	40
Figura 6. Fotografía de <i>Tetraselmis</i> sp.	45
Figura 7. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	50
Figura 8. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	50
Figura 9. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	51
Figura 10. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	51
Figura 11. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	52
Figura 12. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	52
Figura 13. Contenido de biomasa en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a las diferentes DFFFA.	53
Figura 14. Contenido de lípidos en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a las diferentes DFFFA.	54
Figura 15. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	61
Figura 16. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	62
Figura 17. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Tetraselmis</i> sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	62
Figura 18. Fotografía de <i>Dunaliella</i> sp.	64
Figura 19. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	69

Figura 20. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 900 mol m ⁻² s ⁻¹	69
Figura 21. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	70
Figura 22. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 1500 mol m ⁻² s ⁻¹	70
Figura 23. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	71
Figura 24. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 2000 mol m ⁻² s ⁻¹	71
Figura 25. Contenido de biomasa en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a las diferentes DFFFA.	72
Figura 26. Contenido de lípidos en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a las diferentes DFFFA.	73
Figura 27. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 900 μmol m ⁻² s ⁻¹	79
Figura 28. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	80
Figura 29. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a 2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	81
Figura 30. Fotografía de <i>Nannochloropsis</i> sp.	83
Figura 31. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 900 μmol m ⁻² s ⁻¹	89
Figura 32. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 900 mol m ⁻² s ⁻¹	89
Figura 33. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	90
Figura 34. Tinción con Rojo Nilo de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 1500 mol m ⁻² s ⁻¹	90
Figura 35. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	91
Figura 36. Tinción con Rojo Nilo de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 2000 mol m ⁻² s ⁻¹	91
Figura 37. Contenido de biomasa en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a las diferentes DFFFA.....	92
Figura 38. Contenido de lípidos en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a las diferentes DFFFA.....	93

Figura 39. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100
Figura 40. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100
Figura 41. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	101
Figura 42. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	102
Figura 43. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$..	103
Figura 44. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	103
Figura 45. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	104
Figura 46. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	104
Figura 47. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	105
Figura 48. Reactor tipo laguna de alta tasa.....	108
Figura 49. Cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. en el reactor tipo laguna de alta tasa.	109
Figura 50. Variación del pH durante el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp.	110
Figura 51. Concentración de biomasa en el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. en pequeña laguna simulando una laguna de oxidación de alta tasa.....	111
Figura 52. Concentración de lípidos en el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp. en pequeña laguna simulando una laguna de oxidación de alta tasa.....	112
Figura 53. Concentración de nitrógeno total en el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp.	113
Figura 54. Concentración de ortofosfatos en el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp.....	113
Figura 55. Concentración de materia orgánica medida como DQO en el cultivo de <i>Tetraselmis</i> sp.....	114
Figura 56. Modelo conceptual de producción de lípidos en las microalgas en condiciones de crecimiento sin estrés, adaptado de [108], [171], [172], [122], [173], [106], [174], [175], [176], [177], [178], [107] y [179]......	118
Figura 57. Modelo conceptual de producción de lípidos en las microalgas en condiciones de crecimiento con estrés por deficiencia de nitrógeno y exceso de luz, adaptado de [108], [171], [172], [122], [173], [106], [174], [175], [176], [177], [178], [107] y [179].	119

Figura 58. Crecimiento semicontinuo de <i>Tetraselmis</i> sp. según el modelo logístico propuesto	121
Figura 59. Remoción de biomasa en la prueba de jarras mediante variación de dosis de quitosano.....	122
Figura 60. Remoción de biomasa en la prueba de jarras mediante variación de pH.....	123
Figura 61. Coagulación floculación del cultivo de la microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	123
Figura 62. Cromatograma de los lípidos extraídos de la primera fase de crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp.....	125
Figura 63. Cromatograma de los lípidos extraídos de la segunda fase de crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp.....	127
Figura 64. Cromatograma de los lípidos extraídos de la tercera fase de crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp.....	129
Figura 65. Cromatograma de los lípidos extraídos de la cuarta fase de crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp.....	131

Resumen

El cultivo de maricultura se ha incrementado en las últimas décadas, generando aguas de proceso contaminadas que impactan negativamente los ecosistemas costeros. Por esta razón se requieren sistemas de tratamiento que sean económicamente viables, lo cual se puede lograr al implementar sistemas depuradores operados para favorecer la obtención de subproductos energéticamente útiles, además de llevar a cabo la remoción de contaminantes. En este trabajo se cultivaron las microalgas *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp. en ambientes controlados para depurar efluentes que simulen aguas residuales de maricultura. El cultivo se realizó en sistemas de una sola etapa, en volúmenes de 1.5L, induciendo estrés por diferentes densidades de flujos de fotones (900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y bajas concentraciones de nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo) alcanzadas durante la fase estacionaria de crecimiento, en la cual las microalgas aumentaron su contenido de lípidos. Los mejores resultados fueron obtenidos con la microalga *Tetraselmis* sp. que alcanzó una productividad de biomasa de 132.8 $\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$ en los cultivos a 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta misma microalga obtuvo la mejor productividad de lípidos, de 29.5 $\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$, en los cultivos con una densidad de flujo de fotones de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde su productividad de biomasa fue de 124.5 $\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$. En el caso de *Tetraselmis* sp., el contenido de lípidos al final de la fase estacionaria (120 mg L^{-1}) fue el doble que el que tenía al final de la fase logarítmica de crecimiento (60 mg L^{-1}). Las tres especies de microalgas removieron más del 90 % de nitrógeno total (nitrógeno amoniacal, nitratos y nitritos) y de ortofosfatos y el 80 % de carbono (medido como demanda química de oxígeno).

Debido a que se obtuvieron los mejores resultados con *Tetraselmis* sp., esta especie se cultivó en una laguna de alta tasa con 70 L de medio conteniendo 45 mg L^{-1} de nitratos, 10 mg L^{-1} de nitritos, 30 mg L^{-1} de amonio, 17 mg L^{-1} de ortofosfatos y 270 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$ de materia orgánica disuelta medida como demanda química de oxígeno (DQO). El cultivo se mantuvo con un fotoperiodo de 12 h:12 h luz:oscuridad con una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Se realizó un cultivo semicontinuo en donde al llegar a la fase estacionaria se extrajo la mitad de volumen de cultivo y se adicionaban 35 L de medio de cultivo. Se realizaron 3 etapas de cultivo obteniéndose 1.193 $\text{g L}^{-1} \pm 0.006 \text{g L}^{-1}$ de biomasa seca, con un contenido de lípidos de 62.161 $\text{mg g}^{-1} \pm 3.478 \text{mg g}^{-1}$. El escalamiento de los cultivos tuvo un efecto negativo en la productividad de biomasa y lípidos siendo menor que en los cultivos a escala laboratorio. En este caso se obtuvo una productividad de biomasa de 43.3 $\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$ y una productividad de lípidos de 5.57 $\text{mg L}^{-1} \text{día}^{-1}$. La remoción de nutrientes obtenida fue de $95.5 \pm 0.4 \%$ para nitrógeno total, $94.4 \pm 0.5 \%$ para ortofosfatos y $61.4 \pm 3.9 \%$ de DQO. Con estos resultados se constata que es factible emplear esta microalga para el tratamiento de aguas residuales de la maricultura, con el beneficio de obtener biomasa con una mayor cantidad de lípidos susceptibles de ser transformados a biodiesel, un producto de valor agregado que puede ayudar a reducir los costos de tratamiento del agua residual.

Abstract

Mariculture production has increased in the last decades, with untreated wastewater discharged directly into the sea, impacting coastal ecosystems. There is a need for mariculture wastewater treatment systems that are cost-effective. This can be met by the implementation of wastewater treatment systems that in addition to removing pollutants are capable of producing valuable by-products such as biomass for the biofuel industry. In this study, *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. microalgae were cultivated in controlled environments simulating mariculture wastewaters. Single stage culture systems were used to grow these microalgae, the growing conditions included inducing stress with different photon flux densities (900, 1500 and 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and low carbon, nitrogen and phosphorus concentrations obtained at the stationary phase, in order to force these microalgae to increase their lipid content. The best results were obtained with *Tetraselmis* sp., which achieved 132.8 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$ of biomass productivity at 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nevertheless the best lipid productivity was reached at 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, also by *Tetraselmis* sp., being 29.5 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$, where biomass productivity was of 124.5 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$. All three microalgae species were able to remove >90% of nitrogen and orthophosphates, and 80% of carbon, which makes them suitable for treating mariculture wastewater, and in addition, represent a valuable high lipid content biomass byproduct usable as raw material for biodiesel synthesis.

In the second phase of the experiment consisted in the cultivation of *Tetraselmis* sp. in synthetic water simulating mariculture wastewater to carry out its treatment and use the produced biomass as a value-added product through the production of biodiesel from its fatty acids. The microalgae was cultivated in a raceway lagoon with 70 L of medium containing 45 mg L^{-1} of nitrates, 10 mg L^{-1} of nitrites, 30 mg L^{-1} of ammonium, 17 mg L^{-1} of phosphates and 270 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$ of dissolved organic matter measured as chemical oxygen demand (COD). The culture was maintained with a photoperiod of 12 h: 12 h light: darkness with a photosynthetically active photons flux density of 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a temperature of 23 ± 2 ° C. A semi-continuous culture was carried out where at the stationary phase, half of the culture volume was extracted and 35 L of culture medium are added, in each stage. Three stages of cultivation were done, obtaining 1.193 ± 0.006 g L^{-1} of dry biomass, with a biomass productivity of 57.44 ± 6.84 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$, with a lipid content of 62.161 ± 3.478 mg g^{-1} , resulting in a lipid productivity of 5.57 ± 0.93 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$. The removal obtained were 95.5 ± 0.4 % of total nitrogen, 94.4 ± 0.5 % of orthophosphates and 61.4 ± 3.9 % of COD. With these results it can be noted that the use of this microalgae to carry out mariculture wastewater treatment with the possibility of producing biodiesel, reducing treatment costs is feasible.

Introducción

La producción de la acuicultura se ha incrementado de forma dramática en los pasados 40 años [1], representando el sector de la producción de alimentos de mayor crecimiento. Actualmente la industria de la acuicultura está produciendo mayor cantidad de alimento que el producido por la pesca. Esta expansión se refleja en el aumento de las áreas de producción, el avance en la tecnología, pero también en el uso de recursos como tierra, agua, alimento, energía, medicamentos y productos químicos que conllevan a la explotación de recursos naturales. El crecimiento de esta industria conlleva al aumento de productos de desecho que causan daños ambientales principalmente por las emisiones a la atmósfera y la descarga de aguas residuales, además de producir riesgos potenciales para la salud de otras especies. [2]. Las aguas residuales provenientes de la acuicultura son ricas en nitrógeno, fósforo y sustancias orgánicas y su tratamiento siempre ha sido un problema para el desarrollo sustentable de esta industria. Aunque existen diferentes tecnologías y métodos que han sido utilizados para el tratamiento de las mismas, su operación es cara y se requiere una gran inversión inicial, lo cual ha limitado su aplicación [3]. Existen otros posibles tratamientos más económicos para reciclar los nutrientes presentes en el agua residual y producir simultáneamente alimento para los peces y mariscos cultivados en los sistemas de acuicultura, como los tratamientos a base de microalgas [4].

La reducción de la contaminación generada por los sistemas de acuicultura puede alcanzarse mediante el cultivo de microalgas en las aguas residuales generadas, pudiendo reciclar los contaminantes presentes. Tradicionalmente han sido utilizadas para larvicultura (como alimento de otras especies), sin embargo también pueden utilizarse para consumo humano ya que producen productos farmacéuticos y benéficos para la salud además de sustancias que pueden ser utilizadas para la producción de biocombustibles [5].

La producción a bajo costo y con menor impacto ambiental de biocombustibles para el transporte depende de la utilización de agua de fuentes no tradicionales y no potables, por lo que el uso de agua residual, cuerpos de agua contaminados o efluentes de plantas de tratamiento pueden ser utilizados para ese propósito con el objetivo de cultivar algas que mejoren la calidad de este tipo de aguas a través del consumo de los contaminantes presentes [6]. Las microalgas son una de las mejores materias primas para la producción de combustibles sustentables, que replacen los combustibles fósiles, debido a sus altas tasas de crecimiento en comparación con las plantas terrestres, la habilidad de crecer en tierra no cultivable y su alto contenido de compuestos energéticos, bajo las condiciones adecuadas de cultivo, los cuales pueden ser químicamente transformados a combustibles usando las tecnologías existentes [7].

Los costos de la obtención de aceites de microalgas exceden, actualmente, los de la producción de aceites vegetales, por lo cual su obtención no es económicamente viable. Estos costos podrían reducirse mejorando la productividad volumétrica o por área de los sistemas de producción de aceites de microalgas. La intensidad de la luz, la concentración de nutrientes, el pH y la temperatura son importantes parámetros de cultivo para las microalgas y pueden por tanto afectar la productividad, calidad y rendimiento de la producción de aceite de las mismas [8].

En la actualidad hay una competencia cada vez mayor por agua, energía y nutrientes, pudiéndose utilizar el agua residual para la recuperación de estos valiosos recursos, lo cual

apenas está siendo explorado. Hasta ahora el agua residual ha sido considerada como un desecho que tiene que tratarse y disponerse, por lo que se debe cambiar la forma en la cual se ha llevado a cabo el manejo del agua residual, considerándola una fuente de nutrientes y energía, además de la misma agua que puede ser utilizada nuevamente. Mediante el tratamiento del agua residual con microalgas se da la opción de reciclar el agua y transferir la energía y los nutrientes contenidos en la misma a la biomasa microalgal que posteriormente puede ser utilizada para la producción de otros productos como son los biocombustibles.

Objetivos

Objetivo principal

Producir biomasa microalgal y subproductos útiles de tres diferentes especies de microalgas, a partir del tratamiento de agua que simula un efluente de la maricultura bajo diferentes condiciones experimentales.

Objetivos específicos

Evaluar a nivel matraz, en cultivos separados de *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp., el efecto que tiene la concentración de nitrógeno y la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos (DFFFA) sobre la bioacumulación de lípidos, contenido de clorofila y la productividad de biomasa.

Determinar, en cultivos de la microalga que haya generado la mejor respuesta, el efecto del cambio de volumen a un reactor (laguna de oxidación de alta tasa) de 70 L alimentado de manera semi-continua, sobre su productividad de biomasa y contenido de lípidos.

Determinar el rendimiento y calidad del biodiesel obtenido del cultivo de la microalga previamente seleccionada.

Proponer un modelo conceptual que permita entender la relación que existe entre la concentración de nitrógeno presente en el cultivo y la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos que este recibe con la productividad de lípidos en la microalga.

Hipótesis

Es posible obtener, mediante la disminución de la concentración de nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) y/o la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos, productividades de biomasa y lípidos similares a las obtenidas en la bibliografía (las productividades de biomasa más altas reportadas se encuentran alrededor de $500 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y las productividades de lípidos de alrededor de $65 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, Tabla 3), mediante el cultivo bajo condiciones controladas en agua que simule un efluente de la maricultura y que no se afecte la productividad de biomasa y lípidos en el cultivo a mayor volumen.

Antecedentes

Sistemas de acuicultura

Los sistemas de acuicultura son aquellos en donde se lleva a cabo el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas; sobre todo para el consumo humano. Esta actividad de cultivo implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección de los depredadores, entre otras [9]. La acuicultura es una tradición milenaria, pero en las últimas décadas ha ganado popularidad desde los puntos de vista de producción alimentaria, seguridad alimentaria y para proveer oportunidades de empleo y fuente de ingresos [10]. Sin embargo ha sido criticada por sus impactos a la biodiversidad y por su sobredependencia de recursos naturales [10]. En la actualidad la acuicultura produce casi la mitad del pescado que se consume a nivel mundial. Del año 2000 al 2013 la producción acuícola pasó de 32.4 millones de toneladas a 70.2 millones de toneladas. Con este crecimiento se puede esperar que esta industria sea la principal fuente de pescado para consumo humano en los próximos años. Sin embargo esto también será un reto para el manejo sustentable de los recursos [11]

La acuicultura se ha desarrollado en años recientes en México, ya que tiene beneficios sociales y económicos que resultan en una fuente de alimento para la población [12],[13]. Sin embargo esta actividad ocasiona impactos sobre los ecosistemas, afectando las áreas cercanas a los cultivos y a los organismos que habitan esas áreas [13]. Algunos de los efectos adversos generados al medio ambiente son la destrucción de áreas naturales para la construcción de estanques, la salinización de los suelos y los aportes de materia orgánica y nutrientes al ambiente costero marino [14].

La acuicultura se divide en tres diferentes ambientes que son: agua fresca, agua salobre y maricultura, actualmente más de la mitad de la producción es en agua fresca, seguida de la maricultura y por último en agua salobre. Los sistemas de acuicultura también varían en cuanto a su grado de producción y se dividen en sistemas extensivos, semiintensivos e intensivos. Los sistemas extensivos se caracterizan por tener un bajo uso de recursos y por lo tanto bajos rendimientos. Al incrementar la intensificación se requiere mayor cantidad de alimento como en el caso de los sistemas semi-intensivos, sin embargo los sistemas intensivos dependen en gran medida o incluso completamente en el suministro de aportes externos y de tecnología [11]. El grado de impacto ambiental ocasionado por la acuicultura se relaciona directamente con el tipo de sistema de producción que se implemente. Los sistemas extensivos, semiintensivos e intensivos de producción son los más utilizados. Conforme se intensifica el sistema de producción, se requieren mayor cantidad de insumos y materias primas [15]. Según el sistema de producción, existe un régimen de recambio de agua que garantiza la eliminación de depósitos de materia orgánica y de otras sustancias inorgánicas presentes en el estanque. En una granja de producción semi-intensiva de camarón se puede tener una tasa de recambio diario de agua del 15% del volumen total. Esto da una idea de la cantidad de aguas residuales descargadas a los ecosistemas circundantes [16].

La mala planeación y operación de este desarrollo puede impactar de manera negativa la integridad del ambiente costero. La alteración ecológica del ambiente costero por la

producción acuícola genera efectos adversos de esta industria como la deforestación de manglar, el desvío de esteros, el uso intensivo de agua y la descarga de aguas residuales. [17]. Por lo general los sistemas de acuicultura se concentran en áreas pequeñas, lo que aumenta la cantidad de nutrientes descargados localmente. Esto contribuye a la eutrofización que aumenta la ocurrencia, intensidad y duración de las condiciones hipóxicas en las aguas costeras alrededor del mundo. Esto seguirá en aumento al aumentar la producción de esta industria [18]. El crecimiento descontrolado de las granjas de peces y camarón se traduce en el vertido de grandes volúmenes de efluentes diluidos en diferentes puntos. Muchos de los cultivos se realizan en estanques los cuales tienen efluentes no solo al ser drenados y cuando hay recambio de agua, sino también cuando llueve, lo que resulta en fuentes de contaminación no puntuales [19]. Mientras la industria de la acuicultura se desarrolla intensivamente, su impacto ambiental aumenta. Las descargas de agua provenientes de esta industria deterioran el ambiente al mismo tiempo que aumenta la necesidad de producción de peces y mariscos para alimento [20].

Es una práctica común, tanto en México como en otros países, que las aguas residuales de los cultivos sean descargadas a los estuarios circundantes sin ningún tratamiento. Por lo cual se requieren estrategias de remediación por los efectos contaminantes que tiene la acuicultura en el ambiente. [17]. Esto ha causado preocupación en cuanto a los impactos ambientales, sobre todo por las descargas de nitrógeno y fósforo que estimulan la producción primaria y por lo tanto la eutrofización en los cuerpos de agua receptores y los sistemas marinos. [18].

Algunos de los efectos nocivos, relacionados al impacto ambiental, causados por la acuicultura son la destrucción de sitios naturales como manglares y humedales, diseminación de enfermedades, disminución de la biodiversidad natural por el escape de especies no nativas, la contaminación de cuerpos de agua y acuíferos por la descarga de efluentes [21] y por otro lado, la pesca excesiva de peces para la producción de alimento y aceite de pescado para el consumo de las especies cultivadas [22]. En algunos casos, la acuicultura en estanques ocasiona contaminación en el agua subterránea y suelo, esto por la posible filtración de agua salobre proveniente de los estanques de cultivo [23]. Las prácticas acuícolas van degradando el medio ambiente tanto por las descargas de agua con grandes cantidades de desechos, como por el alimento no consumido que se sedimenta en el fondo marino, dañando al ambiente. Además se introducen antibióticos y sustancias químicas al ecosistema. Las actividades que tienen un impacto en el ambiente en el proceso productivo del camarón son la adición de alimento a los cultivos, el recambio de agua, la desinfección y lavado de estanques y la cosecha [15].

En los sistemas acuícolas semiintensivos, comúnmente se adicionan nutrientes con la finalidad de aumentar la productividad natural. Los nutrientes más utilizados son los inorgánicos (fertilizantes con diferentes combinaciones de nitrógeno, fósforo y potasio), también son utilizados los orgánicos (abonos, desechos vegetales, metales traza y silicatos), aunque en menor medida [23]. En los cultivos intensivos se adicionan grandes cantidades de alimento rico en proteína para sostener el rápido crecimiento de los organismos cultivados. [24]. Aunque estas prácticas pueden aumentar la producción, su uso indiscriminado puede ocasionar contaminación en el suelo y el agua [23].

La excesiva adición de alimentos y el excesivo uso de fertilizantes y sustancias químicas, enriquecen las aguas con nutrientes y contaminantes, además de virus y bacterias. La

dispersión de materia orgánica de las granjas de salmón cambia la biodiversidad de la microflora de los sedimentos béticos. La descarga de efluentes contaminados del cultivo de camarón ha causado una fuerte eutrofización local en las lagunas costeras del Golfo de California en México, entre otras regiones [11]. De los fertilizantes y alimento que se adicionan a los estanques para mejorar la producción de las especies cultivadas, solamente entre un 25 y 30 % son recuperados en los organismos durante la cosecha. Esto ocasiona que los efluentes descargados tengan mayores concentraciones de nutrientes, plancton, sólidos suspendidos y demanda de oxígeno que los cuerpos de agua donde se descargan, lo que los convierte en fuentes de contaminación (Boyd, 2003, [24]. Cuando se realiza la cosecha de los organismos, hay un mezclado en los estanques provocando que se resuspenda el sedimento lo que provoca altas concentraciones de nitrógeno, fósforo, sólidos suspendidos y demanda bioquímica de oxígeno en el efluente. La resuspensión y oxidación del sedimento, compuestos reducidos y materia orgánica durante la cosecha puede resultar en bajo oxígeno disuelto y bajo pH [25].

La eficiencia en la retención de nutrientes en los organismos producidos es en general menor al 35 %. Los nutrientes disueltos son en general ricos en nitrógeno mientras que los nutrientes particulados son ricos en fósforo. En un cultivo de moluscos en promedio se retiene alrededor del 33 % de nitrógeno y el 22 % del fósforo en los organismos, alrededor del 40 % del nitrógeno y el 47 % del fósforo van a los sedimentos y el 27 % de nitrógeno y el 31 % del fósforo se quedan disueltos en el agua. En un cultivo de peces en promedio se retiene alrededor del 36 % de nitrógeno y el 33 % del fósforo en los organismos, alrededor del 10 % del nitrógeno y el 40 % del fósforo van a los sedimentos y el 54 % de nitrógeno y el 27 % del fósforo se quedan disueltos en el agua. En los cultivos de camarón en promedio se retiene alrededor del 25 % de nitrógeno y el 10 % del fósforo en los organismos, alrededor del 20 % del nitrógeno y el 72 % del fósforo van a los sedimentos y el 45 % de nitrógeno y el 18 % del fósforo se quedan disueltos en el agua [26].

Para asegurar una calidad de agua adecuada en los cultivos, se descarga el agua residual a los cuerpos de agua costeros adyacentes, lo que causa la liberación de nutrientes y sólidos suspendidos estimulando o exacerbando la eutrofización y los florecimientos algales que causan serios problemas en el ecosistema acuático. Las pobres o nulas regulaciones ambientales y la falta de planeación y estrategias de manejo a nivel internacional han causado una seria degradación ambiental en las últimas décadas. La acuicultura depende de la producción natural de recursos por parte de los ecosistemas circundantes, por lo que no puede haber una coexistencia sustentable entre un hábitat costero y el desarrollo de esta industria [11].

En algunos cuerpos de agua la rápida producción de biomasa en la columna de agua puede facilitar la asimilación de los nutrientes, los flujos de marea también pueden mitigar los impactos del agua residual y los efectos sobre el ambiente receptor, cuando los niveles de descarga y/o las concentraciones de contaminantes son bajas. Sin embargo, los impactos de la acuicultura intensiva han hecho que se adapten mejores prácticas de manejo [24].

El agua residual proveniente de la acuicultura contiene principalmente materia orgánica no disuelta compuesta por alimento que no ha sido comido por las especies cultivadas, heces y bacterias y nutrientes inorgánicos disueltos como amonio, nitritos, nitratos y compuestos con fósforo [22]. La producción de materia orgánica, nitrógeno y fósforo está relacionada

con la conversión de alimento por parte de los organismos cultivados y difiere con diferentes dietas, temperaturas, especies y tamaño de organismos y sistemas de cultivo [21].

Entre los años 2000 y 2010 la descarga de nitrógeno de la maricultura aumentó de 0.3 a 0.6 millones de toneladas y de 0.04 a 0.1 millones de toneladas de fósforo por año. Por lo que la contribución de la acuicultura a la descarga de nutrientes es del orden del 1 al 2 % [18].

Una de las implicaciones de las descargas de nutrientes de la maricultura no es solo que la capacidad asimilativa del ambiente pueda ser excedida causando hipoxia, es que además los cambios en la calidad de nutrientes producidos por la maricultura, promueven ambientes que favorecen florecimientos algales nocivos. Las algas nocivas son aquellas que pueden intoxicar o matar a los organismos de la maricultura y que pueden causar daño a la salud humana debido a que las toxinas que pueden acumularse en los organismos marinos que posteriormente se utilizan para consumo humano. Las diferentes formas y proporciones de productos en los efluentes dependiendo de las condiciones de la maricultura contribuyen a los diferentes tipos de algas que proliferan en los diferentes ambientes, debido a la preferencia de nutrientes de los diferentes tipos de algas, pudiendo estimular el crecimiento de florecimiento de algas nocivas. El grado al cual los florecimientos de algas nocivas están asociadas a la maricultura depende de la intensidad de la operación del cultivo y al grado en que los cuerpos receptores de agua retienen las descargas [26]. Una pequeña parte del nitrógeno descargado se encuentra en forma de urea, siendo la mayor parte de las descargas en forma de amonio. La proporción de amonio y urea varía por las condiciones ambientales y la dieta. La urea puede estimular el crecimiento de cierto tipo de fitoplancton en aguas costeras lo que puede causar un cambio de las especies predominantes a algas dañinas que son nocivas para el ecosistema, debido a que producen toxinas que pueden causar la muerte de peces e indirectamente causar problemas de salud a humanos [18].

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de nutrientes en efluentes del cultivo de camarón obtenidas de 14 publicaciones, mostrándose las concentraciones mínima y máxima encontradas y la mediana de las 14 caracterizaciones.

Tabla 1. Concentraciones de contaminantes en efluentes de cultivo de camarón [25].

Variable	Mínimo	Mediana	Máximo
Nitrógeno total (mg L ⁻¹)	0.02	2.04	2600
Nitritos (mg L ⁻¹)	0.0	0.05	0.91
Nitratos (mg L ⁻¹)	0.001	0.30	7.00
Nitrógeno amoniacal (mg L ⁻¹)	0.01	0.38	7.87
Fósforo total (mg L ⁻¹)	0.01	0.26	110
Fósforo soluble reactivo (mg L ⁻¹)	0.0	0.09	11.2
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	0.4	5.6	9.6
pH	6.3	8.2	9.2
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	1.3	8.9	50.7
Sólidos suspendidos totales (mg L ⁻¹)	10	108	3671
Sólidos suspendidos volátiles (mg L ⁻¹)	8	43	713
Clorofila en Sólidos Suspendidos Totales (µg L ⁻¹)	1	67	694

En la actualidad para poder mantener el crecimiento de los sistemas de acuicultura se debe reducir tanto la cantidad de agua requerida como el efluente descargado por unidad de biomasa producida, además los sistemas deben proveer cierto grado de resistencia a la ocurrencia de enfermedades [27]. Existen varios tratamientos para remover los contaminantes presentes en el agua residual proveniente de la acuicultura como los filtros biológicos, biodiscos y filtros de lecho fluidizado, entre otros [20]. Estos sistemas son utilizados para remover el carbono y el nitrógeno pero tienen bajas eficiencias de remoción de fósforo y una gran desventaja que es la acumulación de lodos, que deben ser removidos del sistema y tratados posteriormente [28]. Los procesos de tratamiento de las aguas residuales por lo general están diseñados para eliminar la materia fácilmente sedimentable y biodegradar la materia orgánica presente, dando como resultado un efluente claro que se descarga en los cuerpos de agua. Sin embargo, este efluente contiene nitrógeno y fósforo disueltos que causan eutrofización, además pueden contener contaminantes persistentes y metales pesados que causan problemas a largo plazo [29]. Varias técnicas físicas y químicas están disponibles para el tratamiento de aguas residuales, como la desnitrificación, usadas para la remoción de compuestos nitrogenados y la precipitación química usada para remover el fósforo. Estos métodos cada vez se utilizan menos por no ser amigables con el ambiente al producir lodos tóxicos como subproductos [1].

No existen regulaciones para la descarga de efluentes en la industria de la acuicultura, muchas veces en la administración ambiental se usan lo que se denomina las mejores prácticas de manejo para prevenir los impactos ambientales negativos, permitiendo que se lleve a cabo la producción de una manera económicamente viable. Esto implica que estas prácticas no siempre son las mejores y tienen que ser modificadas al avanzar la tecnología, además de ser específicas para cada sitio. En acuicultura, muchas de estas prácticas son listas de sugerencias, dejando que los productores decidan el método de implementarlas. [19].

En general es difícil cambiar las prácticas de manejo de los granjeros, para que adopten las mejores prácticas de manejo, la mejor forma de hacerlo es cuando al adoptarlas se ve un incremento claro de las ganancias. Además para lograr esto se debe promover una educación ambiental en los productores, enfocándose no solo en los beneficios ambientales, sino también en el aumento de las ganancias como resultado de la implementación de las mejores prácticas de manejo. Existen dos organizaciones no gubernamentales que han elaborado estándares para los efluentes de la acuicultura que son la Alianza Global de la Acuicultura (GAA por sus siglas en inglés, Global Aquaculture Alliance) y la Corporación Internacional de Finanzas (IFC por sus siglas en inglés, International Finance Corporation) [19]. En la Tabla 2 se presentan los estándares de estas organizaciones.

Tabla 2. Límites permisibles de descarga en los efluentes provenientes de la acuicultura según la Alianza Global de la Acuicultura (GAA) y la Corporación Internacional de Finanzas (IFC) [19].

Variable	GAA	IFC
pH	6.0-9.0	6 a 9
Sólidos suspendidos totales	50 mg L ⁻¹ o menos	50 mg L ⁻¹
Fósforo total	0.3 mg L ⁻¹ o menos	NP
Nitrógeno amoniacal total	3 mg L ⁻¹ o menos	NP
DBO5	30 mg L ⁻¹ o menos	50 mg L ⁻¹
Oxígeno disuelto	5 o más	NP
Grasas y aceites	NP	10 mg L ⁻¹
Coliformes	NP	4000 NMP L-1 (NMP= número más probable)
Temperatura	NP	Incremento menor o igual a 3° C

*NP: no se presenta

Hasta hace poco el cultivo de peces se llevaba a cabo en áreas donde los recursos acuáticos eran casi ilimitados, utilizando sistemas de flujo continuo [30], pero en zonas costeras las reservas de agua pueden estar limitadas debido a los regímenes de las mareas y las regulaciones ambientales. Por esta razón se alienta la utilización de sistemas de recirculación y diferentes tecnologías para el tratamiento de agua [31]. Las técnicas que involucran la recirculación del agua residual después de un tratamiento biológico y/o una filtración pueden hacer a la acuicultura casi independiente de agua disponible [30]. La reutilización del agua se ve limitada por la acumulación de productos de desecho excretados por los peces, como el dióxido de carbono, el nitrógeno amoniacal, los sólidos disueltos, los nitratos y los fosfatos que son difíciles de remover [32]. Otra desventaja de estos sistemas es que son sistemas complejos que requieren monitoreo constante además de tener altos costos de operación, por lo que en ocasiones no resultan económicamente viables, por lo cual se requiere reducir su costo mediante la producción de organismos que tengan cierto valor económico [33]. Aunque hay cierto interés en el reúso de agua y los sistemas de producción cerrados, actualmente no es económica ni técnicamente viable realizar cultivos de acuicultura sin descarga [19], [34].

La investigación en sistemas de tratamiento con microalgas, aunque no son nuevos, han sido poco estudiados y solamente existen escasos estudios de este tipo. Existen restricciones para el desarrollo a gran escala de estos sistemas como son la caracterización, la adaptación a cada región, tipo de efluente, el uso final del efluente tratado, especies de algas y las demandas del consumidor final [35]. Los procesos de recirculación en la acuicultura se encuentran principalmente en cultivos en exterior con organismos de agua fresca y agua salada. Los nutrientes del cultivo son removidos mediante una combinación de procesos de asimilación y desasimilación, mediados por organismos heterótrofos y fotótrofos, en este proceso, se integra el cultivo de las especies para consumo con las especies que se utilizan para el tratamiento de las aguas residuales. Las especies que pueden utilizarse para el tratamiento de los desechos son macroalgas, plantas y microalgas, en algunos casos, también de producen otros organismos como los animales filtradores, detritívoros y bacterias heterótrofas también son producidos. Estos sistemas se conocen como sistemas multitróficos de acuicultura integrada, en donde la producción de las

especies acuáticas primarias se combina con el crecimiento de otras especies con valor económico, lo que provee una solución para incrementar la productividad del sistema, reduciendo los desechos producidos [21]. Los sistemas integrados de acuicultura con más de un organismo a diferentes niveles tróficos, todo en un solo sistema de producción, incrementa la retención de nutrientes en el sistema con lo que se reduce el contenido de estos en los efluentes. Estos tipos de sistemas son difíciles de implementar ya que se dificulta el manejo de múltiples especies en sistemas de producción intensificada [18].

Las microalgas son más apropiadas que las macroalgas u otras plantas para ser utilizadas como productoras de compuestos de interés ya que tienen altas tasas de crecimiento y pueden adaptarse a diversas condiciones naturales o artificiales que promuevan la producción de productos deseados como los lípidos [36]. El tratamiento de las descargas puede contribuir tanto a la mitigación de impactos como a obtener mejores resultados de producción de compuestos de interés. Las microalgas pueden utilizarse para mejorar la calidad del agua al absorber el nitrógeno excretado por las especies cultivadas. Al llevar a cabo un tratamiento del agua, la misma puede ser reutilizada lo que disminuiría la dependencia del aporte de aguas naturales. Además las microalgas pueden utilizarse como una fuente de alimento natural [17].

El uso de efluentes de los sistemas de producción intensivos de la producción de acuicultura es una alternativa potencial de medio de cultivo para microalgas. De estos efluentes el que sobresale es el cultivo súper intensivo en bio-floc de camarones, ya que la tecnología se basa en mínimo recambio de agua, con altos contenidos de materia orgánica en forma de alimento sin consumir, fertilizantes y productos de excreción, lo que resulta en efluentes con gran potencial de eutrofización [37].

Cultivo de microalgas

La capacidad de producción de biomasa de microalgas depende de la latitud geográfica donde se ubiquen los reactores para el cultivo, ya que el régimen de luz solar varía dependiendo de la ubicación geográfica [38]. Las condiciones climáticas del sitio como la irradiación y las temperaturas afectan directamente la actividad fotosintética y por lo tanto su productividad [39], otros factores que afectan la productividad son el fotoperiodo y las variaciones estacionales. Por esta razón para la selección de una especie de microalga para la producción de biodiesel se debe tomar en cuenta, además de su productividad de biomasa y lípidos, su capacidad de adaptarse a los cambios en las condiciones externas como son la temperatura y los ciclos diurnos [40]. La dependencia del crecimiento de las microalgas con las variaciones estacionales crean una diferencia anual entre la capacidad de producción y procesamiento de la biomasa, ya que hay épocas donde pueden existir excesos de producción, mientras que otra época del año la baja productividad de las microalgas ocasiona un exceso en la capacidad de procesamiento [41].

Cuando se realizan cultivos externos las condiciones de luz varían durante el día. En presencia de luz las microalgas llevan a cabo la fotosíntesis, formando carbohidratos, que son utilizados en la noche durante el proceso de respiración. Esta es la razón de que durante el día se vea un incremento de la biomasa mientras que en la noche existe una pérdida de biomasa debido al uso de carbohidratos para la síntesis de compuestos celulares. Por lo tanto la productividad neta es el resultado de la fotosíntesis y la respiración [42].

La mayor parte de los estudios realizados con cultivos de microalgas se hacen bajo condiciones axénicas (cultivos puros), lo cual no sería económicamente viable de mantener en sistemas abiertos a gran escala. Se ha demostrado que la presencia de bacterias en el cultivo puede mejorar la producción de microalgas haciendo que el sistema mantenga su función cuando se presentan alteraciones externas. Esto puede deberse a que las bacterias mineralizan los sustratos orgánicos a sustratos inorgánicos, que son preferidos por las microalgas, producen factores de crecimiento y micronutrientes que ayudan al crecimiento de las microalgas y transforman el amonio, que es tóxico para las microalgas, en nitratos y nitritos [43].

Microalgas para tratamiento de aguas residuales provenientes de la acuicultura

Uno de los más serios problemas que tendrá la humanidad en un futuro será la reducción de las reservas de agua potable. El desarrollo de la industria de la acuicultura es un factor que contribuye a esto. El amonio y los nitritos son químicos tóxicos que resultan del cultivo de peces, especialmente en el cultivo intensivo. Estas sustancias también son tóxicas para los humanos, por lo que deben ser eliminadas de las aguas residuales y esto puede lograrse mediante procesos biológicos. Las microalgas tienen potencial para remover estos contaminantes y otros por su alta capacidad de consumir nutrientes [44].

En la actualidad los procesos de tratamiento de aguas residuales generalmente consumen grandes cantidades de energía y requieren una fuerte inversión y costos de operación. Durante el tratamiento se liberan gases de efecto invernadero y otras sustancias volátiles, además recursos valiosos como los fosfatos y el nitrógeno no son recuperados. Todo esto hace que los procesos no sean sustentables. La sustentabilidad ambiental de un proceso de tratamiento de aguas residuales requiere que la calidad del efluente cumpla con los estándares de recuperación y reúso y que la transferencia de la contaminación a fases gaseosa y sólida se reduzca a un nivel aceptable [45].

En algunos criaderos de especies para la acuicultura se cultivan microalgas para la larvicultura, es decir, que se utilizan como alimento para las crías de peces, camarones, etc. o como alimento de otras especies pequeñas como artemias con las cuales se alimentarán a los peces y mariscos [5]. Grandes cantidades de agua y nutrientes son requeridos para el cultivo comercial de microalgas, este consumo de recursos podría reducirse cultivando especies marinas en aguas salinas usando nutrientes de efluentes contaminados [46]. El agua residual puede ser procesada en lagunas, produciendo biomasa de las microalgas que puede ser un recurso alimenticio para varias especies acuáticas [47] o darle otros usos además como la extracción del aceite para producir biodiesel [5].

Las microalgas han sido utilizadas para la ficoremediación debido a que no se generan más contaminantes después de la remediación cuando la biomasa generada es utilizada para producir biocombustibles [4]. Los cultivos de microalgas ofrecen un tratamiento de aguas residuales interesante, ya que pueden utilizar el nitrógeno y fósforo inorgánicos para su crecimiento, además de ser capaces de remover metales pesados así como algunos compuestos orgánicos tóxicos [29]. La bioremediación de las aguas residuales mediante microalgas es un sistema sustentable, siempre y cuando la remoción de nutrientes sea eficiente y la biomasa producida sea utilizada [48].

La utilización de agua salada para el cultivo de microalgas puede prevenir la contaminación debido a las altas salinidades, que impiden el crecimiento de algunos microorganismos, lo que hace que estos sistemas sean más propensos para la producción a gran escala [49].

Producción de biodiesel

Las reservas de petróleo podrían agotarse para el 2050 debido al crecimiento poblacional que deriva en un incremento en la demanda de este combustible fósil [50]. El incremento de la demanda energética amenaza la disponibilidad de energía sustentable para las generaciones futuras [51]. La demanda de combustibles líquidos en el sector de transporte ha ido incrementando [46], por esta razón el biodiesel ha atraído atención siendo un combustible renovable, puede ser carbono neutral [52], no tóxico y biodegradable representando una alternativa a los combustibles fósiles [53]. Otras de las ventajas que presenta el biodiesel es que no contiene compuestos aromáticos, tiene bajas emisiones de monóxido de carbono, azufre, partículas e hidrocarburos sin quemar, tiene un punto de ignición alto (150 °C) por lo cual es menos volátil que el petrodiesel, haciéndolo más seguro al momento de transportarlo o manipularlo. Sin embargo tiene la desventaja de que tiene altas emisiones de óxidos de nitrógeno [54].

Uno de los grandes problemas de la producción de biocombustibles es que el consumo de recursos durante el ciclo de vida resulta conflictivo. El uso de combustibles fósiles durante el ciclo de vida de los biocombustibles puede resultar en una producción neta de energía negativa. El uso de fertilizantes que contienen fósforo tiene implicaciones negativas debido a que este elemento es esencial para cualquier tipo de biomasa tanto para la producción de alimentos como la de biocombustibles, por lo que cualquier tipo de biomasa que domine el mercado de los biocombustibles consumirá grandes cantidades de fósforo, afectando de manera negativa el abasto de alimentos a nivel mundial [55]. En el caso de las microalgas no se requiere de la adición de fósforo a los cultivos, si estos se realizan con aguas residuales, siendo este uno de los contaminantes, además este elemento podría reciclarse al ser recuperado por las microalgas [56].

El cultivo comercial de organismos fotosintéticos eficientes, como microalgas y cianobacterias, con altos contenidos lipídicos podría cubrir la demanda de biodiesel sin los problemas antes mencionados [52]. El cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles tiene ventajas sobre la producción con granos, debido a que se requiere un mínimo de tierra para su cultivo y no se requiere el uso de herbicidas ni pesticidas [48], pueden cultivarse en aguas salinas o salobres y aguas residuales y su cultivo puede mantenerse durante todo el año [53], además comparadas con las plantas terrestres, las microalgas crecen rápidamente, proveyendo hasta 20 veces más aceite por unidad de área que la planta con mejores rendimientos de producción de aceite, ya que tienen altas tasas de crecimiento y se pueden obtener contenidos de aceite de entre 20 y 30 % en varias especies [57]. Otra ventaja es que las microalgas pueden alterar su composición celular como respuesta a diferentes condiciones de cultivo, lo que resulta en un potencial de producción de lípidos mucho mayor que el de las plantas terrestres [58].

Aunque actualmente el biodiesel no es comercialmente viable, existen estrategias para reducir su costo de producción [59], [60]. El costo de la obtención de lípidos de microalgas

está asociado de forma directa con la eficiencia de producción y la energía consumida por litro durante la separación de microalgas del medio de cultivo, la cual se reduce cuando la cantidad de biomasa aumenta en el cultivo. Estudios a nivel experimental y comercial han demostrado que el costo de los biocombustibles a partir de microalgas en un sistema altamente productivo se debe principalmente al crecimiento de las microalgas y en menor medida a la cosecha y extracción de lípidos [61]. La reducción de los costos de cultivo también dependen de la maximización tanto de la tasa de crecimiento como del contenido lipídico de las microalgas [62].

Microalgas para la producción de biodiesel

La preocupación sobre la reducción de las reservas de petróleo y el deterioro del ambiente producto de la utilización de combustibles fósiles ha propiciado el desarrollo de fuentes de energía renovables y amigables con el ambiente [52]. Las microalgas son una de las biomásas con mayor potencial para la producción de energías renovables, sin embargo los costos de producción han limitado su industrialización. Las microalgas pueden utilizar el nitrógeno, el fósforo y algunas sustancias orgánicas presentes en el agua residual para crecer, con lo cual se lleva a cabo el tratamiento del agua residual y al mismo tiempo se produce biomasa que puede ser transformada en energía, reduciendo el costo del tratamiento del agua residual [3], [63].

Actualmente la producción de biocombustibles, como el bioetanol y el biodiesel, se producen a partir de plantas comestibles que crecen en tierra cultivable, siendo materias primas de primera generación. La producción ha aumentado hasta el punto que los cultivos para producir biocombustibles están compitiendo con la producción de comida por lo cual no son sustentables [7]. Además de los problemas antes mencionados, una vez producido el biocombustible, se deben tratar los desechos generados que se denominan granos secos de destilería con solubles. Estos podrían utilizarse como una fuente de alimento para animales por su contenido de proteína y fósforo, sin embargo presentan problemas como son su variabilidad nutricional, su consistencia y su digestibilidad. Existen estudios que han demostrado que especies cultivadas en la acuicultura de régimen tanto herbívoro como omnívoro son más eficientes transformando los granos secos de destilería con solubles que otras especies de la industria ganadera [64]. Los biocombustibles derivados de materias primas de segunda generación como residuos lignocelulósicos y plantas no comestibles pueden parecer una mejor opción, sin embargo también se requiere tierra para su cultivo y el uso de energía para el transporte de las materias primas, lo que reduce el retorno neto de energía [7].

Las microalgas son una posible materia prima para los biocombustibles a partir de materias primas de tercera generación, debido a que tienen tasas de crecimiento más altas que las plantas por lo cual requieren una menor área para su cultivo y no requieren de tierra cultivable para crecer. Además bajo ciertas condiciones de cultivo su producción de lípidos puede ser mucho mayor que el de las plantas utilizadas para producir biodiesel. Sin embargo todavía hay algunos retos técnicos que hay que resolver antes de que la producción comercial de biocombustibles a partir de microalgas sea realidad [7]. Para superar algunos de estos retos técnicos se ha propuesto el cultivo de microalgas en aguas residuales debido a que las productividades de lípidos obtenidas son mayores que aquellas

obtenidas en cultivos con medios de cultivo enriquecidos, además de que su cultivo resulta más económico [65]. Las microalgas utilizan el CO₂ transformándolo en oxígeno y biomasa, lo que puede abrir opciones en la utilización de los denominados bonos de cuidado y limpieza ambiental [64].

La explotación comercial de las microalgas es una actividad relativamente nueva y se ha hecho más significativa a partir de las décadas pasadas. Este mercado se ha enfocado sobre todo a la industria de los nutraceuticos que tienen un alto valor comercial. El cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles enfrenta varios retos ya que el producto final es de bajo valor comercial por lo que se requiere una cadena de producción eficiente y optimizada [7]. A pesar de las barreras tecnológicas, políticas y de mercado que enfrenta la producción de biocombustibles a partir de microalgas, existen oportunidades de negocio si la producción de esta alternativa se realiza como parte de un sistema integrado mayor. En este caso a partir de la biomasa de microalgas se pueden producir otros biocombustibles y productos químicos de alto valor comercial, lo cual contribuiría a la viabilidad económica del sistema integrado. Adicionalmente los sistemas de tratamiento de aguas residuales para la producción de biocombustibles y productos químicos contribuirían sustancialmente a los ahorros en el costo total de la producción de biomasa de microalgas [66].

Se puede aumentar la acumulación de lípidos utilizando un medio de cultivo pobre en nitrógeno, sin embargo por lo general un muy alto contenido de lípidos conlleva a una baja tasa de crecimiento que tiene como consecuencia una baja productividad lipídica. Por lo cual para alcanzar la máxima productividad de lípidos durante un cultivo continuo de las microalgas es importante determinar una frecuencia óptima de alimentación y cosecha que considere las tasas de crecimiento y el contenido lipídico de las microalgas [61]. Otra estrategia para aumentar el contenido de lípidos es cultivar las microalgas hasta alcanzar una alta concentración de biomasa y después inducir la acumulación lipídica sometiendo al cultivo a condiciones de estrés como la baja concentración de nutrientes o la alta intensidad de luz [67].

Estrategias para aumentar la productividad de lípidos en las microalgas

Para que los biocombustibles puedan tener viabilidad económica se requiere un cultivo eficiente de microalgas con alta productividad de lípidos, lo cual sigue siendo un desafío [68]. Aunque en algunos procesos se pretende obtener la mayor cantidad de biomasa posible, se debe tener en cuenta que el objetivo principal del cultivo es alcanzar la mayor concentración del producto deseado en el menor tiempo posible [69]. La productividad de lípidos está determinada por la productividad de biomasa y el contenido de lípidos, por lo que para alcanzar la mayor productividad de lípidos, se deben considerar los efectos sobre estas dos variables [53].

Las microalgas pueden cultivarse a gran escala en fotobioreactores o lagunas, con lo cual se puede mejorar su productividad en comparación con ambientes naturales. Sin embargo los parámetros que influyen sobre el crecimiento de estos microorganismos pueden variar debido a los grandes volúmenes de cultivo lo que puede provocar condiciones de cultivo poco favorables. Las variables que son más difíciles de controlar son la luz solar y la temperatura, esta última puede fluctuar entre 10 y 45° C en regiones templadas, alcanzando

temperaturas que no son toleradas por las especies de microalgas que se cultivan comercialmente [70].

La viabilidad del biodiesel obtenido a partir de microalgas se ha discutido extensamente debido a que existen factores limitantes para su producción. Se sabe que el crecimiento celular y la acumulación de lípidos no suceden al mismo tiempo durante el cultivo, por lo que las estrategias para aumentar la acumulación de lípidos resultan en una baja cantidad de biomasa y por lo tanto en una baja productividad de lípidos. Para evitar este problema se ha propuesto un cultivo en dos etapas, donde primero se cultivan las microalgas en condiciones óptimas de crecimiento y posteriormente se transfieren a cultivos donde factores como la irradiancia, los nutrientes y el pH son modificados para promover la acumulación de lípidos a expensas del crecimiento celular [71]. Otros de los factores que se modifican son la concentración hierro [72], la salinidad [73], la temperatura [56], la concentración de carbono [74] y el fósforo [75]. Las condiciones que requieren las microalgas varían a lo largo del ciclo de cultivo, por ejemplo, los requerimientos de luz y aireación pueden ser diferentes durante la fase de adaptación, la fase logarítmica y la fase estacionaria de crecimiento, esto no ha sido estudiado a profundidad [76]. En general todos los parámetros utilizados para aumentar la productividad de lípidos implican un gasto en los cultivos debido a que se requiere la adición de sustancias como en la regulación de pH, la salinidad o el hierro. La modificación de la temperatura también implica un gasto energético al igual que la irradiación si se utiliza luz artificial. La concentración de nutrientes no requiere la adición de sustancias debido a que se requieren bajas concentraciones de éstos y las microalgas los consumen, reduciendo sus concentraciones, la irradiación no puede controlarse al utilizarse luz solar, pero puede utilizarse como un indicador para determinar el momento de la cosecha de las microalgas.

Una de las estrategias que se han utilizado para aumentar el contenido de la biomasa es el cultivo heterótrofo, en donde se cultivan las microalgas en ausencia de luz con la adición de fuentes orgánicas de carbono y energía. Una de las ventajas del cultivo heterótrofo es que las densidades celulares son muy altas lo que reduce los costos de separación de la biomasa, que es una de las operaciones más costosas en la producción de biocombustibles [69]. El contenido de lípidos en los cultivos heterótrofos es generalmente similar o mayor que en los cultivos fotoautótrofos y al haber una mayor cantidad de biomasa se tiene una mayor productividad lipídica, lo que ahorra costos de procesamiento, pero el hecho de requerir compuestos orgánicos y bioreactores hace que el cultivo heterótrofo sea más costoso que el cultivo autótrofo [53].

Para evitar los problemas del cultivo heterótrofo se puede complementar el cultivo fotoautótrofo con sustratos orgánicos, teniendo un cultivo mixótrofo. Este tipo de cultivo es en donde las microalgas pueden crecer tanto de manera fotoautótrofa, en donde fijan el carbono inorgánico a través de la fotosíntesis, como heterótrofa, en donde asimilan compuestos orgánicos mediante la respiración aerobia[53]. En el cultivo mixótrofo puede mejorar la tasa de crecimiento y la producción de lípidos, resultando en un ciclo de crecimiento más corto y un incremento en la productividad de biomasa y contenido de lípidos [77], lo que incrementa la productividad de los mismos, además se reduce la pérdida de biomasa en las horas de oscuridad [53].

Tabla 3. Productividades de biomasa y lípidos de diferentes especies de microalgas marinas.

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L⁻¹ día⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L⁻¹ día⁻¹)	Referencia
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	40.0	17.6	[78]
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Cultivo autótrofo en fotobioreactor de 15 L con condiciones controladas en medio de cultivo específico	44.1	7.2	[79]
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	70.0	21.8	[78]
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	20.5	6.9	[80]
<i>Chaetoceros</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	380	21	[81]
<i>Chlorella</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio en medios de cultivo diluidos en agua marina sintética con deficiencia de nutrientes	44.1-53.4	13.1-22.0	[82]
<i>Chlorella</i> sp.	Cultivo a nivel laboratorio en medios de cultivo específicos	61	3.9	[83]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Cultivo heterótrofo a nivel laboratorio en un medio de cultivo específico	6400.0	3652.7	[84]
<i>Dunaliella salina</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio en un medio de cultivo con alta exposición a la luz	93.3	29.7	[85]
<i>Dunaliella primolecta</i>	Cultivo fotoautótrofo en medio de cultivo	90.0	20.7	[86]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	120.0	20.0	[87]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	45.0	10.5	[88]

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	367.2	62.4	[89]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en medio de cultivo	487.0	56.0	[90]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	487.0	56.0	[90]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno	341.0	38.0	[90]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo específico	7.5	2.5	[91]
<i>Isochrysis galbana</i>	Cultivo autótrofo en fotobioreactor de 15 L con condiciones controladas en medio de cultivo específico	24.9	5.8	[79]
<i>Isochrysis galbana</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	401.0	56.0	[90]
<i>Isochrysis galbana</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno	149.0	65.0	[90]
<i>Isochrysis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	21.1	7.2	[92]
<i>Monallanthus salina</i>	Cultivo fotoautótrofo en medio de cultivo específico	80.0	16.8-17.6	[86]
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	60.0	18.0	[93]
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Cultivo a nivel laboratorio en dos etapas, con un medio de cultivo y con deficiencia de nitrógeno	490.0	51.0	[94]

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	116.7	31.0	[95]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	370-480	84.0-142.0	[96]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	130.0	13.00	[97]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno	80.0	38.4	[97]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Cultivo autótrofo en fotobioreactor de 15 L con condiciones controladas en medio de cultivo específico	20.4	1.7	[79]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio en dos etapas, con un medio de cultivo y luego con deficiencia de nutrientes	152.3-287.6	64.7	[98]
<i>Nannochloropsis salina</i>	Cultivo en un efluente proveniente de un digestor anaerobio	67.6-91.9	14.2-29.2	[61]
<i>Nannochloropsis salina</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	30.0	12.9	[93]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo en agua salada con 50 % de agua residual municipal	35.3	9.8	[67]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	46.5	19.5	[99]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	20.0	6.3	[92]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	25.1	10.2	[80]

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	330	13	[81]
<i>Navicula pelliculosa</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio en agua marina sintética	65.7	26.4	[82]
<i>Pavlova salina</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	160.0	49.4	[78]
<i>Pavlova lutheri</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	140.0	50.2	[78]
<i>Pavlova lutheri</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	7-28	1.1-10.1	[100]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	240.0	44.8	[78]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo en agua residual de efluente de cultivo de rodaballo	17.0	2.3	[35]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo autótrofo en fotobioreactor de 15 L con condiciones controladas en medio de cultivo específico	18.6	4.7	[79]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	486.0	64.0	[90]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno	122.0	51.0	[90]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	17.7	9.1	[80]
<i>Porphyridium cruentum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	370.0	34.8	[78]
<i>Porphyridium cruentum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en medio de cultivo	679.0	35.0	[90]

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
<i>Porphyridium cruentum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en medio de cultivo	679.0	35.0	[90]
<i>Porphyridium cruentum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con deficiencia de nitrógeno	308.0	38.0	[90]
<i>Porphyridium cruentum</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo con un ciclo de luz:oscuridad de 18 h:6 h	100.0	18.3	[101]
<i>Rhodomonas</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	6.0	0.8	[92]
<i>Synechocystis</i> sp.	Cultivo en un efluente proveniente de un digestor anaerobio	41.3-150.9	4.9-19.9	[52]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	80.0	17.4	[78]
<i>Tetraselmis eliptica</i>	Cultivo a nivel laboratorio en medios de cultivo específicos	122	14	[83]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	320.0	36.4	[78]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo fotoautótrofo en medio de cultivo a nivel laboratorio	360.0	34.6	[102]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo fotoautótrofo en medio de cultivo a nivel laboratorio con deficiencia de nitrógeno (NO ³⁻)	230.0	18.7	[102]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo autótrofo en fotobioreactor de 15 L con condiciones controladas en medio de cultivo específico	64.6	4.8	[79]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	32.0	13.6	[80]

Especie de microalga	Tipo de cultivo	Productividad de biomasa (mg L⁻¹ día⁻¹)	Productividad de lípidos (mg L⁻¹ día⁻¹)	Referencia
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	370	9	[81]
<i>Tetraselmis</i> sp.	Cultivo autótrofo a nivel laboratorio con condiciones controladas en un medio de cultivo	22.7	2.4	[92]
<i>Tetraselmis</i> sp.	Cultivo a nivel laboratorio en medio de cultivo específico	118.0	21.4-48.9	[103]
<i>Tetraselmis</i> sp.	Cultivo a nivel laboratorio en medio de cultivo específico	243.0	85.5	[104]
<i>Tetraselmis</i> sp.	Cultivo a nivel laboratorio en medio de cultivo específico con suficiencia de nitrógeno (NO ³⁻)	126.0	47.3	[105]

Acumulación de lípidos en microalgas bajo condiciones de estrés

Las microalgas están emergiendo como una materia prima para la producción de biocombustibles, sin embargo es necesario caracterizar las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de compuestos energéticos, como los lípidos, además de los factores ambientales que tienen influencia en su acumulación, para así poder desarrollar todo el potencial de estos microorganismos como recursos energéticos [106]. Las microalgas son capaces de sobrevivir a ambientes extremos, al poder cambiar su metabolismo como respuesta a condiciones ambientales adversas. En estas condiciones las microalgas por lo general tienen la tendencia a acumular lípidos neutros para protegerse de la fotooxidación. [107]. Bajo condiciones óptimas de cultivo, las microalgas sintetizan ácidos grasos principalmente como lípidos de membranas, sin embargo, factores como la irradiancia y la disponibilidad de nutrientes entre otros afectan tanto la composición de los lípidos como su contenido [106]. Por lo general las bajas intensidades de luz inducen la formación de lípidos polares, particularmente los lípidos de membrana asociados al cloroplasto, mientras las altas intensidades de luz provocan una reducción de los lípidos polares totales, aumentando la cantidad de lípidos neutros de reserva, principalmente triacilgliceroles [108]. La limitación de nitrógeno es el factor más utilizado para aumentar la acumulación de lípidos, ya que es fácil de manipular y de bajo costo comparado con otros factores [109], además de ser de fácil aplicación tanto a escala laboratorio como a gran escala. Sin embargo, la mayor limitación es la diferencia existente entre las productividades de biomasa y lípidos [107]. Para tener una producción de triacilgliceroles bajo condiciones optimizadas, las cepas de microalgas no solo deben ser elegidas por su capacidad de almacenar altas cantidades de triacilgliceroles, sino también por su habilidad de mantener su productividad de biomasa bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno [110].

En microalgas sometidas a limitación de nitrógeno se restringe la división celular, además de haber una reducción de compuestos ricos en nitrógeno [111], [112], [113], [107]. Al no haber nitrógeno para sintetizar proteínas, se mantiene únicamente la síntesis esencial de éstas [111], [112], habiendo una reducción del contenido de clorofila y enzimas clave para la asimilación de CO₂ [106]. Probablemente la disminución de proteínas se deba a que las células degradan sus compuestos nitrogenados para mantener su contenido intracelular de nitrógeno preservando sus funciones metabólicas normales [114], además de obtener la energía y el carbono necesarios para la síntesis de triacilgliceroles [106]. La clorofila es un compuesto accesible rico en nitrógeno, por lo que también es reciclado como una fuente de este nutriente, para mantener las funciones de la célula al no haber nitrógeno disponible en el medio de cultivo [115].

La limitación de nitrógeno causa tres cambios principales, el decrecimiento del contenido de la membrana de los tilacoides, la estimulación de la hidrólisis de fosfolípidos y la activación de la enzima para realizar la síntesis de ácidos grasos. Estos cambios causan el incremento del contenido intracelular de ácidos grasos [75]. Los altos contenidos de lípidos se alcanzan después de periodos prolongados de limitación de nitrógeno lo cual también ocasiona un decremento en la actividad fotosintética. [110]. Al principio de la limitación de nitrógeno la asimilación de carbono excede la demanda para la duplicación celular, por lo que este exceso se utiliza en la síntesis de carbohidratos. Una limitación de nitrógeno prolongada activa una segunda respuesta donde el flujo de carbono se redirige a la síntesis

de triacilgliceroles [113]. Bajo estas condiciones se observó un aumento en la abundancia de proteínas implicadas en el metabolismo de nitrógeno y amino ácidos, fosforilación oxidativa así como glucólisis/gluconeogénesis, mientras que las proteínas implicadas en la síntesis de proteínas disminuyó [116]. Los genes implicados en el rompimiento de ácidos grasos y lípidos se reprimen bajo estas condiciones. Al reprimir la β -oxidación se mantiene una alta concentración de lípidos en la célula. Algunos genes asociados a la autofagia se sobreexpresaron bajo condiciones de limitación de nitrógeno, para proveer de una cantidad mayor de ácidos grasos. También se aumenta la ruta de las pentosas fosfato para producir el NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) necesario en la biosíntesis de lípidos [117].

Durante la limitación de nutrientes el flujo de carbono fotosintético cambia a diferentes rutas para canalizar la energía metabólica a diferentes compuestos ricos en energía como los lípidos y los carbohidratos, habiendo una competencia entre la síntesis de estos compuestos [114], lo que provoca el cambio de las rutas de biosíntesis de lípidos para sintetizar más lípidos neutros que lípidos de membrana [107]. Bajo condiciones de estrés, la síntesis de triacilgliceroles permite la captura continua de energía y carbono que posteriormente puede ser empleada cuando se restablezcan condiciones favorables de crecimiento [118].

La reducción de la síntesis de proteínas y las tasas fotosintéticas, resulta en un flujo metabólico hacia la biosíntesis lipídica [119], los ácidos grasos almacenados durante la limitación de nitrógeno provienen del reciclaje de los lípidos presentes en el cloroplasto [118],[120]. Algunos son sintetizados de novo en los cloroplastos y pueden ser exportados directamente a los cuerpos lipídicos o pueden pasar al retículo endoplásmico para ser incorporados a diacilgliceroles formando triacilgliceroles. Otra fuente de ácidos grasos es el reciclaje de fosfoglicerolípido en el retículo endoplásmico [120]. Los cuerpos lipídicos podrían funcionar como almacenamiento de los triacilgliceroles provenientes de las membranas de los plástidos, debido a que la estructura y tamaño de los cloroplastos son reducidos drásticamente bajo condiciones adversas [118]. La síntesis de triacilgliceroles también puede utilizar fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y galactolípido, además de ácidos grasos tóxicos excluidos de la membrana como donantes de grupos acilos, lo que sirve como un mecanismo para detoxificar los lípidos de membrana y depositarlos en forma de triacilgliceroles [108].

La síntesis de novo (síntesis a partir de precursores de bajo peso molecular) de ácidos grasos sirve como un sistema de captura de electrones bajo estrés oxidativo, ya que la primera enzima que participa en la síntesis de triacilgliceroles es regulada por un control redox [118]. En condiciones de estrés, el exceso de electrones que se acumula en la cadena fotosintética de transporte de electrones induce una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que causan la inhibición de la fotosíntesis y daño a las membranas lipídicas, proteínas y otras macromoléculas [108]. Bajo condiciones adversas de crecimiento, se genera un exceso de NADPH que no es utilizado para la duplicación celular, bajo estas condiciones puede haber una sobrerreducción de la cadena fotosintética de transporte de electrones que es prevenida por la acumulación de compuestos reducidos como son los triacilgliceroles [121], [118]. La formación de un ácido graso de 18 carbonos consume el doble de NADPH, proveniente de la cadena de transporte de electrones, que consumiría la síntesis de carbohidratos o proteínas de la misma masa, con lo que se relaja la

sobrerreducida cadena de transporte de electrones bajo altas concentraciones de luz u otra condición de estrés [108]. La acumulación de NADH debido a la disminución de la actividad fotosintética inhibe una enzima, con lo cual se previene que la acetil coenzima A (acetil CoA) entre al ciclo de Krebs. Esto provoca un aumento de la concentración de acetil CoA que activa una enzima clave para la síntesis de ácidos grasos [122]. La ruta de síntesis de triacilgliceroles por lo general está coordinada con la síntesis de carotenoides secundarios. Estos compuestos (caroteno, luteína o astaxantina) son producidos en la ruta de los carotenoides y se esterifican a los triacilgliceroles y son secuestrados en los cuerpos lipídicos en el citosol. La distribución periférica de los cuerpos lipídicos ricos en carotenoides sirven como un protector solar para prevenir o reducir el exceso de luz que entra al cloroplasto bajo estrés [108]

Durante la baja disponibilidad de nitrógeno, la concentración de clorofila disminuye, provocando una disminución en la actividad fotosintética [112], la cual es la fuente principal de energía. Esto provoca que los niveles de gliceraldehído 3 fosfato, el producto principal del ciclo de Calvin, se reduzcan, por lo que la mayor parte del carbono necesario para la síntesis de triacilgliceroles proviene principalmente del metabolismo de carbohidratos [122]. El gliceraldehído 3 fosfato que aún se produce por vía fotosintética, por lo general va directo a la ruta de la biosíntesis de almidón pero también puede ser utilizado como precursor de la acetil CoA para la síntesis de ácidos grasos y del glicerol para la síntesis de triacilgliceroles [106]. La acetil coenzima A es clave para la síntesis de lípidos, una enzima la transforma en malonil CoA para entrar a la ruta de síntesis de lípidos [123],[124],[125].

En las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Coccomyxa* sp., se observó que al haber un agotamiento de nutrientes en el medio, inicia la síntesis de almidón, seguida de una acumulación de triacilgliceroles. En *Chlamydomonas* bajo limitación de nitrógeno, inicialmente hay una acumulación de almidón los primeros días de estrés a través del carbono fijado en la fotosíntesis debido a que al inicio de la limitación de nutrientes hay altos contenidos de proteína y clorofila. Durante esta etapa continúa el crecimiento de las células manteniendo estable el contenido de ácidos grasos para preservar la homeostasis de la membrana mientras que una pequeña proporción se usa para la biosíntesis de triacilgliceroles, los cuales no se sabe si se sintetizan de novo o son reciclados de lípidos de membranas. Después de varios días de estrés comienza la acumulación de triacilgliceroles, mientras que el contenido de almidón comienza a disminuir. Es poco probable que los lípidos sintetizados provengan del carbono fijado durante la fotosíntesis debido a que hay una disminución de la clorofila y las enzimas clave en la fijación de carbono. Además de haber una disminución de la fotosíntesis y de varios procesos anabólicos. Es probable que el carbono necesario para la síntesis de triacilgliceroles se obtenga a expensas de otros componentes celulares como las proteínas, las cuales disminuyen su contenido, del reciclaje del RNA ribosomal por la degradación de los ribosomas, además del almidón y la clorofila. [106]. En *Micractinium pusillum*, la limitación de nitrógeno tuvo como efecto una reducción en el contenido de carbohidratos, sugiriendo que el flujo de carbono cambió de la síntesis de carbohidratos a la de triacilgliceroles. Seguramente la limitación de nitrógeno aumenta la actividad del metabolismo de carbohidratos, especialmente la glucólisis. Tanto la glucólisis como la degradación de aminoácidos dan como resultado el piruvato, el cual puede convertirse a acetil CoA que es un precursor para la síntesis de ácidos grasos [122]. En *Scenedesmus* sp. una disminución de nitrógeno en el medio provocó una disminución

tanto de las clorofilas a y b como de carotenoides en la célula. Sin embargo las relaciones clorofila a/clorofila b y carotenoides/clorofila total se incrementó indicando una disminución en el complejo de cosecha de luz y en la actividad del fotosistema II. Se ha sugerido que el incremento de carotenoides sirve como protección contra el estrés oxidativo inducido por la producción de lípidos [114]. La limitación de nitrógeno en *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp., activa un reordenamiento de las reservas intracelulares de lípidos, para llevar a cabo la síntesis de triacilglicerol pero manteniendo la homeostasis de lípidos en otros compartimentos. Aunque ambas especies responden de manera diferente, las rutas principales se conservan en ambas. Los glucolípidos del cloroplasto son reciclados para la síntesis de triacilglicerol [120]. En *Chlamydomonas* algunos genes que codifican para enzimas que llevan a cabo la acilación de diacilglicerol para sintetizar triacilglicerol incrementaron su transcripción, sin embargo genes que codifican enzimas para la síntesis de novo de ácidos grasos disminuyeron su transcripción [106]. En *Neochloris oleoabundans* durante la limitación de nitrógeno se sobreexpresaron las enzimas lipasas, excepto las triacilglicerol lipasas, lo que se asocia con la reconstrucción de la membrana celular con el propósito de canalizar ácidos grasos a la producción de triacilglicerol. Las lipasas más sobreexpresadas fueron las fosfolipasas para convertir los fosfolípidos y glucerofosfolípidos en ácidos grasos para poder sintetizar triacilglicerol [117].

El fósforo es un nutriente esencial debido a que tiene diversas funciones en la célula como la producción de ATP que es una de las fuentes de energía, además de participar en la formación de ácidos nucleicos, la biosíntesis de fosfolípidos para la biogénesis de membranas entre otras cosas. Es el componente de varios compuestos biológicos que participan en la conversión de energía y la transferencia de información genética. El ortofosfato inorgánico en las células regula la actividad enzimática, rutas metabólicas y procesos de transporte, además de afectar varios aspectos de la fotosíntesis. Por todas estas razones es un elemento esencial en el medio de cultivo [115]. Por lo general la deficiencia de fósforo induce respuestas similares a las inducidas por la limitación de nitrógeno [126]

Producción de carbohidratos en microalgas para producción de bioetanol

Entre los productos de las microalgas, los carbohidratos son uno de los bioproductos y materias primas potenciales para la producción de bioetanol que han ganado interés desde los problemas que enfrenta la energía fósil [127].

El biocombustible más utilizado es el bioetanol, producido a partir de materias primas con altos contenidos de azúcar o almidón, como son la caña de azúcar y la remolacha, y el trigo, maíz y cebada respectivamente que son materias primas de primera generación. Por las desventajas que presentan sobre todo la competir con la producción de alimentos, se optó por utilizar material lignocelulósico que son materias primas de segunda generación. Sin embargo presenta otras desventajas como son que la tecnología para la conversión de materiales lignocelulósicos a etanol todavía está en desarrollo. Aunque la materia prima lignocelulósica es barata, el costo de transformarla en etanol todavía es considerablemente alto, ya que la lignina es difícilmente fermentable o degradable biológicamente [128]. La lignina además de inhibir la degradación de los carbohidratos, debe llevar un procesamiento complicado en cuanto al pretratamiento y la hidrólisis. [129]. Es por estas razones que a

tecnología para transformar los materiales lignocelulósicos en etanol aún está en desarrollo [130].

El costo de los biocombustibles es sobre todo debido a las materias primas, las cuales pueden generar entre un 60 y 70 % del costo total de producción, por lo que se requieren materias primas de bajo costo para satisfacer la demanda de combustibles a nivel mundial [128]. La selección de la materia prima depende de factores económicos, sociales, ambientales e industriales, como son disponibilidad y costo de las materias primas. Sin embargo las desventajas de las materias primas para producción de biocombustibles son principalmente la necesidad de tierras de cultivo y de agua para riego, lo que implica la competencia con la producción de alimentos, la variación de la productividad por factores geográficos y ambientales la necesidad de utilizar herbicidas. Por estas razones es necesario encontrar una materia prima sustentable como podrían ser las microalgas (tercera generación) que no compiten por tierras cultivables y se puede reducir el consumo de agua al utilizar agua residual o agua salina/salobre [129].

Al igual que ocurre con el cultivo de microalgas para biodiesel, la ventaja que tienen éstas sobre otras materias primas son la de tener altas tasas de crecimiento, altas productividades volumétricas, mayor eficiencia de captura de CO₂, capacidad de crecer en tierras no arables, ciclos cortos de cosecha, compatibilidad de producción de combustibles y coproductos en biorefinerías; además de la ausencia de lignina y bajas cantidades de hemicelulosa lo que se traduce en un pretratamiento menor [128]. La producción de biomasa de las microalgas puede ser entre 5 y 10 veces mayor que el de las plantas debido a sus mayores eficiencias fotosintéticas [131].

El procesamiento de la biomasa para la obtención de biocombustibles es crucial para determinar el costo y la sustentabilidad energética de las materias primas utilizadas. La estructura simple de las microalgas simplifica estos procesos haciéndolas candidatas para reemplazar las materias primas convencionales. El reto es mejorar las tecnologías de conversión a bioetanol hasta su nivel industrial usando microalgas como materia prima y al mismo tiempo limitar el consumo adicional de energía [132].

Los carbohidratos son el principal producto proveniente de la fijación del CO₂ por la fotosíntesis, los cuales son acumulados en los plástidos como energía de reserva o se usan como los componentes principales de la pared celular en la forma de celulosa, pectinas y polisacáridos sulfatados. El metabolismo y la composición de los carbohidratos en las microalgas puede diferir significativamente de una especie a otra. Por esta razón se hace necesario seleccionar especies con altas productividades de carbohidratos así como con una composición adecuada para la producción de biocombustibles. Las rutas metabólicas de moléculas energéticas, como lípidos y carbohidratos, están estrechamente ligadas. Algunos estudios han demostrado la competencia entre la síntesis de carbohidratos y lípidos ya que el precursor para la síntesis de triacilglicerol es el glicerol-3-fosfato, producido por el catabolismo de la glucosa. La degradación del almidón produce los metabolitos para la producción de acetil CoA que es el precursor de la síntesis de ácidos grasos. Para lograr aumentar la producción de carbohidratos en las microalgas, primero debe entenderse su metabolismo, con el fin de poder manipularlo, para así aumentar el almacenamiento de glucano, reduciendo la degradación del almidón. Además de bloquear las rutas de síntesis de lípidos, para evitar la degradación de carbohidratos [128].

Actualmente existe un interés industrial en convertir la biomasa de microalgas en biocombustibles, siendo el biodiesel el que ha atraído la mayor atención hasta el momento, mientras que la producción de bioetanol está limitada y ha recibido menos atención [133], debido al alto contenido de lípidos y el proceso más simple de producción de biodiesel [129]. Sin embargo uno de los componentes principales de las microalgas es la fracción de carbohidratos, las algas más productivas tienen grandes cantidades de estos compuestos, las cuales pueden ser muy variables, desde un 4 % hasta un 80 % siendo el promedio de alrededor de un 30 % [134]. Existen especies con contenidos de carbohidratos que pueden alcanzar hasta 40 % de la biomasa seca [135], pudiendo ser utilizadas para la producción de bioetanol. Los géneros *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* y *Tetraselmis* han sido estudiados por su alto contenido de carbohidratos [136], [129], [137]. Incluso la biomasa obtenida después de la extracción de lípidos para la producción de biodiesel puede ser utilizada para la producción de bioetanol debido a que los carbohidratos remanentes, los cuales han sido sacarificados resultando en un caldo que puede fermentarse sin pretratamiento. Esta producción secuencial puede mejorar los costos de producción de biocombustibles a partir de microalgas [137].

La función de la producción de carbohidratos en las microalgas es actuar como componentes estructuras de las paredes celulares y como almacenamiento de la energía necesaria para los procesos metabólicos y permite a las células sobrevivir ciertos periodos bajo condiciones de oscuridad. Los compuestos de reserva permiten a las microalgas ajustar su crecimiento a las condiciones cambiantes del ambiente [138]. Las microalgas almacenan carbohidratos en gránulos de almidón denominados pirenoides, además de contener los carbohidratos de la pared celular y algunos azúcares como arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa y otros menos comunes como ramnosa, fucosa y ácido urónico [139]. Los carbohidratos más comunes presentes en microalgas y cianobacterias usados para producir etanol son almidón, glucógeno y celulosa. El almidón es una de las mayores fuentes de carbono en las microalgas [140]. Algunos de los componentes de la pared celular de las microalgas como celulosa, lignina, pectina, hemicelulosas y proteínas pueden hidrolizarse en monómeros para producir bioetanol [141]. En la forma como se encuentran no son fácilmente fermentables por microorganismos para la producción de etanol, al ser polisacáridos deben ser hidrolizados a azúcares fermentables. Al haber bajas cantidades de hemicelulosa y ausencia de lignina, la transformación a azúcares fermentables se facilita [136], [128], [131], [135]. La hidrólisis puede hacerse por vía química o enzimática. La vía química es rápida, fácil y barata pero puede producir compuestos no deseados (furfural e hidroximetilfurfural, generados por la deshidratación de pentosas y hexosas respectivamente) que inhiban la fermentación [136].

Los organismos fotosintéticos son favorables para la producción de biocombustibles debido a su bajo costo de cultivo, sin embargo los rendimientos obtenidos bajo condiciones normales de cultivo son insatisfactorios [140]. Para aumentar la viabilidad económica de la producción es necesario utilizar la luz solar natural en cultivos abiertos como una solución a la producción comercial de biocombustibles [133]. Al igual que lo que pasa con los lípidos, la acumulación de carbohidratos ocurre bajo condiciones de estrés, resultando en una baja productividad de biomasa. Por lo tanto el aumento en la productividad de carbohidratos es lo que se requiere aumentar para hacer el bioetanol comercialmente viable [128]. El estrés ambiental puede cambiar la composición de las microalgas, al controlar los factores ambientales se afecta tanto el crecimiento algal como su composición [129].

Se ha visto que bajo condiciones limitadas de nitrógeno, se causa un incremento en los contenidos de lípidos y carbohidratos resultando por ejemplo en un decremento del contenido de proteínas, lo que puede ser aprovechado para producir biomasa rica en carbohidratos para la producción de etanol, uno de los biocombustibles más utilizados actualmente. [140]. El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento ya que se utiliza para la formación de aminoácidos, cloroplasto, enzimas, coenzimas, material genético y por lo tanto para la asimilación del mismo nitrógeno. Las diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato, nitrito, amonio, urea) pueden influenciar la composición bioquímica de la célula [128]. Durante la limitación de nitrógeno las microalgas pueden transformar las macromoléculas con altos contenidos de nitrógeno en moléculas con alto contenido energético como lípidos o carbohidratos [128], [129]. Debido a que la producción de lípidos se da en condiciones de bajo contenido de nitrógeno, las aguas residuales ricas en nitrógeno, como las descargas de la cría de cerdos, generarán biomasa con bajo contenido de lípidos. Estas aguas podrían ser utilizadas para el cultivo de microalgas con altos contenidos de carbohidratos donde no se necesiten condiciones tan estrictas de limitación de nitrógeno como en el caso de lípidos [142].

Las microalgas responden al estrés osmótico acumulando carbohidratos intracelulares de bajo peso molecular como la trehalosa y la sacarosa entre otros que actúan como osmóticos. El incremento en el contenido de carbohidratos protege al alga de daños salinos. La tolerancia a diferentes concentraciones de sal es dependiente de las especies [138].

El contenido de carbohidratos en la célula depende de las especies y las condiciones de cultivo. La concentración de CO₂ afecta la acumulación de carbohidratos, un decremento de CO₂ resulta en un incremento del contenido de carbohidratos en la biomasa, debido a que los mecanismos de concentración de carbono hacen que la célula adquiera y concentre carbono inorgánico del ambiente extracelular. Este mecanismo es inducido por bajas concentraciones de dióxido de carbono y causa una fijación eficiente de este compuesto durante la fotosíntesis [138].

La irradiancia es esencial para el crecimiento autótrofo de las microalgas, por lo que la eficiencia de la energía luminosa es uno de los factores limitantes en los cultivos a gran escala de microalgas. La intensidad de luz afecta la acumulación de carbohidratos en las microalgas, sin embargo la acumulación no solo depende de la intensidad luminosa, sino de otros parámetros ambientales, por lo que es difícil como se correlacionan estas variables [128]. El efecto positivo de incrementar la intensidad luminosa sobre la acumulación de almidón y lípidos, solo se logra hasta cierto punto que es donde comienza la saturación de la fotosíntesis, lo cual se da en condiciones particulares para cada especie. [140]

Los principios de bioquímica demuestran que la conversión teórica del espectro total de la luz solar a materia orgánica es de alrededor del 10 % implicando una restricción estequiométrica y termodinámica a la formación de productos energéticos. Además de esto los rendimientos de cultivos al aire libre tienen de un tercio a un décimo del rendimiento teórico, razón por la cual se debe mejorar la eficiencia de los sistemas fotosintéticos para tener procesos rentables. Los polisacáridos de las algas además de poder ser utilizados para producir biocombustibles, representan una clase de compuestos de alto valor con aplicaciones en alimentos, cosméticos, textiles, estabilizadores, emulsificantes, lubricantes, agentes espesantes y drogas clínicas. Los polisacáridos sulfatados tienen actividad

farmacológica como antioxidantes, antitumorígenos, anticoagulantes, antiinflamatorios, antivirales y agentes inmunomoduladores [130].

Perspectivas de producción de biodiesel a partir de microalgas

Para poder implementar la comercialización del biodiesel a partir de microalgas se requiere maximizar la productividad de lípidos, incrementar la velocidad de crecimiento, identificar inductores químicos, utilizar ingeniería metabólica (para activar rutas metabólicas que aumenten la síntesis de lípidos) y genómica y desarrollar mejores sistemas de cultivo. La productividad de biomasa y lípidos se pueden aumentar mediante la utilización de la ingeniería genética, identificando genes específicos que estén regulados químicamente o mediante la manipulación de rutas metabólicas [143]. Sin embargo no se ha realizado mucha investigación en cuanto a modificación genética de microalgas debido a que no se conocen ampliamente los mecanismos de regulación de la expresión génica y no se tienen herramientas específicas de biología molecular. Otra de las causas es la preocupación existente en cuanto a contaminación biológica [49], el posible daño ecológico y la legislación restrictiva que dificultan este tipo de investigación [50].

Además de aumentar la síntesis de lípidos en las microalgas, se deben obtener varios subproductos de las biomasa, debido a que producir únicamente biocombustibles de la biomasa obtenida no es una opción económicamente viable [144]. Al integrar el concepto de biorefinería al tratamiento de aguas residuales proveerá una utilización eficiente de la biomasa y favorecerá la viabilidad económica del sistema [56]. El concepto de biorefinería es un proceso industrial en el cual la biomasa es convertida en una gran cantidad de compuestos bioquímicos, materiales y productos energéticos. El concepto es análogo al de una refinería de crudo en donde se obtienen varios productos del petróleo. En la biorefinería se utilizan la mayor parte de los compuestos de la biomasa evitando la pérdida de recursos, todos los procesos deben ser eficientes y deben reducir los impactos ambientales o evitarlos. Las microalgas contienen lípidos, proteínas y carbohidratos además de otros compuestos que mediante procesos de conversión química, bioquímica y termoquímica, pueden generar diversos compuestos energéticos. También se pueden extraer productos de alto valor comercial que pueden utilizarse como alimento para animales, nutrición humana, farmacéuticos, nutracéuticos y cosméticos [144].

Se requiere más investigación sobre procesos y tecnologías para reducir los costos de escalamiento y producción. También se requiere hacer más eficientes los procesos de separación y extracción para mejorar la recuperación de productos. Las proyecciones en tiempo real y los modelos de predicción de costos se requieren para poder extrapolar los datos a nivel laboratorio y desarrollar tecnologías [56]. Los biocombustibles a partir de microalgas pueden llegar a ser una realidad, pero se requiere de una gran cantidad de investigación en varios aspectos para hacer llegar estos combustibles a niveles comerciales [143].

Hacen falta metodologías económicamente viables que permitan aumentar el contenido de lípidos en las microalgas, ya que los cultivos en dos etapas requieren dos procesos de separación de la biomasa del medio que es uno de los procesos que requiere alto consumo de energía durante la producción del biodiesel. Además estas metodologías deben implementarse con el uso de aguas residuales ya que en la actualidad se realizan en medios

de cultivo específicos para las microalgas lo que aumenta los costos de producción del biodiesel. Con el uso de aguas residuales se puede reducir el costo de tratamiento de las mismas, produciendo productos con valor comercial a partir de la biomasa obtenida.

Metodología

En la Figura 1 se muestra un diagrama de flujo de las etapas experimentales que se llevaron a cabo durante la realización de la tesis.

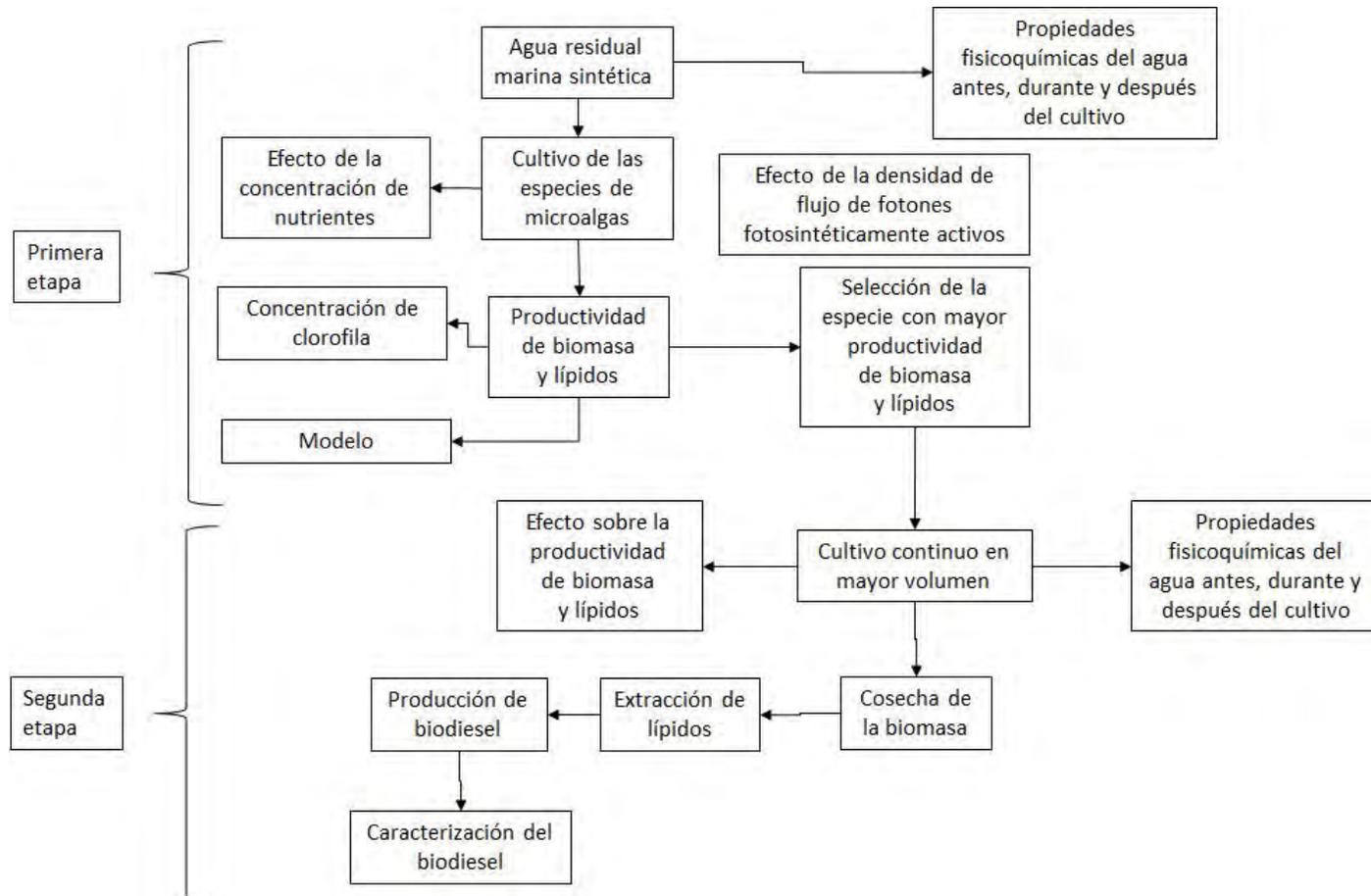


Figura 1. Diagrama de flujo de las etapas experimentales.

Se llevó a cabo una caracterización del agua residual proveniente de la acuicultura de especies marinas, esto con la finalidad de producir un agua residual sintética con parámetros similares, con el objeto de que se puedan controlar los parámetros de cultivo y no existan variaciones debido a las diferentes calidades de lotes de agua residual.

La investigación se planteó en dos etapas. En la primera etapa se llevó a cabo el cultivo de las microalgas (*Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp.) en agua residual sintética bajo condiciones experimentales controladas, utilizando matraces Erlenmeyer de 2 L, con 1.2 L de medio de cultivo y 100 mL de inóculo (2.3 g L^{-1} de biomasa), con aireación constante y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. En esta etapa se monitoreó el contenido de nutrientes presente en el cultivo y al mismo tiempo se midió la cantidad de biomasa seca y el contenido de lípidos de la misma, para determinar cómo afecta la concentración de nutrientes a estos dos parámetros. Esto se realizó con 3 diferentes densidades de flujo de fotones fotosintéticamente activos (DFFFA) (900 , 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para ver el efecto de este parámetro sobre la productividad de biomasa y lípidos. De esta forma se determinó el efecto que tienen en conjunto la concentración de nutrientes y la DFFFA sobre la productividad de lípidos y de biomasa. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del agua para cuantificar la remoción de nutrientes y se determinó la cantidad de clorofila presente en la biomasa, con lo que se pudo estimar el tipo de metabolismo que la microalga podría utilizar para su crecimiento y como este afecta el contenido de lípidos. Se seleccionó la microalga que tuvo la mayor productividad de lípidos para realizar la segunda etapa experimental.

En la segunda etapa, al tener los parámetros de DFFFA y concentración de nutrientes que permitieron obtener la mayor cantidad de biomasa con el mayor contenido de lípidos se realizaron cultivos semi-continuos en volúmenes mayores con lo que se vio el efecto que tiene esto sobre la productividad de biodiesel. Estos cultivos se realizaron en una laguna de oxidación de alta tasa de 0.69 m^2 y con una lámina de agua de 10 cm de profundidad. Posteriormente se hizo la caracterización del biodiesel.

Diseño experimental

Para hacer el análisis estadístico de cada especie de microalga por separado se consideró un modelo completamente al azar, con un factor que corresponde a la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos, este factor contempla niveles que son 900 , 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El otro factor es la concentración de nitrógeno total con varios niveles que son las concentraciones de este nutriente durante el tiempo de cultivo. Se tienen 9 tratamientos debido a que se realizó el cultivo de cada microalga por triplicado en cada diferente DFFFA. Por lo tanto la hipótesis nula es que todos los tratamientos son iguales y la alternativa es que alguno de los tratamientos es diferente. Se utilizó como variable de respuesta, la productividad de lípidos de las microalgas.

Por otro lado para comparar el crecimiento que tuvieron las 3 especies de microalgas en cada una de las 3 DFFFA y la concentración de nitrógeno total se tiene un modelo estadístico de tres factores, uno es la DFFFA que tiene 3 niveles (900 , 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), el otro es la concentración de nitrógeno total con varios niveles (las concentraciones de este nutriente durante el cultivo) y el último son las especies de

microalgas con 3 niveles (*Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp.). La variable de respuesta es la productividad de lípidos en los cultivos. En este caso se probaron tres hipótesis nulas que son que no hay efecto de la interacción entre la DFFFA y la concentración de nitrógeno total, que los efectos de los tratamientos en cuanto a la DFFFA son iguales y que los efectos de los tratamientos en cuanto a la concentración de nitrógeno total son iguales. Las hipótesis alternativas serían que si hay efecto de la interacción entre la DFFFA y la concentración de nitrógeno total, que al menos alguno de los tratamientos respecto a la DFFFA es diferente y que al menos uno de los tratamientos respecto a la concentración de nitrógeno total es diferente.

En todos los casos se hicieron pruebas de Tukey para determinar la diferencia existente entre las medias de los tratamientos. Se trabajó con un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$), tanto para los análisis de varianza como para las pruebas de Tukey.

Los análisis estadísticos se hicieron en el programa RStudio.

Cultivo de las microalgas

Se realizaron los cultivos de las microalgas *Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Dunaliella* sp. en agua residual que simula un efluente de maricultura, con concentraciones de 45 mg L⁻¹ de nitratos, 10 mg L⁻¹ de nitritos, 30 mg L⁻¹ de amonio, 17 mg L⁻¹ de ortofosfatos y 270 mg O₂ L⁻¹ de DQO y a 3 diferentes DFFFA que fueron 2000 μmol m⁻² s⁻¹, 1500 μmol m⁻² s⁻¹ y 900 μmol m⁻² s⁻¹. Para los casos de *Tetraselmis* sp. y *Nannochloropsis* sp. el agua tenía una salinidad de 31 ups y para el caso de *Dunaliella* sp. el agua tenía una salinidad de 41 ups. Esto es debido a que esas son las salinidades a las que crece cada una de las especies de microalgas.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 L, con 1.2 L de medio de cultivo y 100 mL de inóculo (microalgas preacondicionadas con 2.3 g L⁻¹ de biomasa, después de 15 días de cultivo). Se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Para alcanzar las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono, se adicionó KNO₃, NaNO₂, (NH₄)₂SO₄, K₃PO₄ y acetato de sodio al agua, en las cantidades necesarias para lograr valores cercanos a los del agua residual que simule un efluente de maricultura (acetato de sodio 370 mg L⁻¹, K₃PO₄ 15.6 mg L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 110.1 mg L⁻¹, NaNO₂ 7.5 mg L⁻¹, KNO₃ 73.4 mg L⁻¹). Esto equivale a una relación molar de nitrógeno fósforo (N:P) de 14.6 y una relación N:P másica de 6.6. Estas relaciones son similares a las dadas por [145], que son relaciones N:P observadas para la composición del plancton, la relación molar N:P es 16 y la másica es 7.2.

Determinaciones en el agua

El fósforo presente en el agua se determinó mediante un método colorimétrico donde se forma el fosfomolibdato, que posteriormente se reduce a un compuesto de color azul [146]. Los nitritos se determinaron mediante una reacción química colorimétrica donde se forma un colorante azo [146]. El amonio se determinó mediante la oxidación a nitritos en presencia de hipoclorito [146]. Los nitratos se determinaron mediante una reducción a

nitritos con cloruro de vanadio [147]. Tanto el amonio como los nitratos una vez transformados a nitritos se determinaron de la misma forma que estos.

El pH y el oxígeno disuelto se determinaron mediante electrodos [148].

La salinidad se determinó mediante un hidrómetro Instant Ocean.

Se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) por el método colorimétrico con reflujos cerrados descrito por [149], en donde se agrega una mayor cantidad de sulfato de mercurio para eliminar los cloruros, causantes de interferencia.

Estas determinaciones se realizaron en el agua residual antes del cultivo, durante el tratamiento y al final del tratamiento.

Determinación de clorofila

La clorofila de los cultivos se determinó por un método de extracción con disolventes y cuantificación por espectrofotometría [148].

Densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos

La DFFFA se determinó mediante un medidor de luz Delta Ohm HD 2302.0 y una sonda Delta Ohm Lp 471 PAR.

Selección de las microalgas

Las cepas de microalgas (*Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp.) fueron adquiridas a través de una donación por parte de la Técnica Académica M. en C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán de la Unidad Académica Yucatán de la UNAM.

Se cultivaron las microalgas *Nannochloropsis* sp. por su alto contenido de lípidos, de entre 22 y 30 % de lípidos [150], *Dunaliella* sp. que tiene un contenido de lípidos de entre 36 y 42 % [151] y *Tetraselmis* sp. por su productividad de lípidos de entre 3.9 y 4.8 g m⁻² día [92].

Las algas marinas del género *Tetraselmis* son las más utilizadas en la acuicultura como una fuente de alimentos para algunos peces, ostras y moluscos. Son algas unicelulares flageladas que miden entre 10 y 20 µm, con características adecuadas para su producción en instalaciones a gran escala, ya que pueden soportar un amplio rango de concentraciones de sal y de temperaturas (2 a 34° C). Sus requerimientos nutricionales son mínimos ya que no requiere vitaminas para su crecimiento y puede utilizar el nitrógeno en forma de amonio, urea, nitratos o amino ácidos [152]

Las microalgas del género *Dunaliella* pueden crecer sobre valores de saturación de más de 30 % de NaCl, con lo que se logra evitar la contaminación de otros organismos en cultivos abiertos. La extracción de lípidos no se dificulta tanto debido a que no tienen pared celular y por lo tanto las células son frágiles y fáciles de romper [153].

Agua residual sintética

Se preparó agua de mar artificial con la sal de mar Instant Ocean con una salinidad de 31 g kg⁻¹ en el caso de *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp., y con una salinidad de 40 g kg⁻¹ para el caso de *Dunaliella* sp.

Se adicionaron al agua 370 mg L⁻¹ de acetato de sodio 15.6 mg L⁻¹ de K₃PO₄, 110.1 mg L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 7.5 mg L⁻¹ de NaNO₂ y 73.4 mg L⁻¹ de KNO₃, con el fin de alcanzar las concentraciones de nutrientes presentes en el agua residual caracterizada.

Aclimatación de las microalgas al agua residual

Las microalgas se pusieron a crecer en un medio de cultivo inorgánico (agua destilada con la adición de 1 g L⁻¹ de fertilizante Peters 20-20-20 [154]) para obtener una mayor cantidad de biomasa, posteriormente se hicieron crecer en un medio de cultivo que consista en un 50% de agua residual sintética y en un 50% del medio de cultivo inorgánico, con las algas crecidas en este medio de cultivo se inoculó el agua residual sintética para cultivar a las microalgas [155].

Determinación del crecimiento de las microalgas

Se realizó midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a 680 nm, previamente se determina la relación entre la densidad óptica y el peso seco de la biomasa [156].

Determinación del contenido de lípidos

El contenido de lípidos de la biomasa se determinó mediante una reacción colorimétrica con ácido fosfórico y vainillina [157].

Tinción con Rojo Nilo

Se llevó acabo esta tinción para poder observar la acumulación de lípidos dentro de la microalga, este colorante tiñe de color dorado los cuerpos lipídicos dentro de las microalgas.

Para *Nannochloropsis* sp., se tomaron 2.55 mL del cultivo, se adicionaron 0.45 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 10 µL de Rojo Nilo (0.25 mg en 1 mL de acetona). Se incubó en la oscuridad, 10 min a temperatura ambiente [158].

En el caso de los cultivos de *Tetraselmis* sp., se tomó 1 mL de cultivo y se adicionaron 20 µL de Rojo Nilo. (0.25 mg en 1 mL de acetona). Se incubó en la oscuridad, 10 min a 37° C [159].

Para los cultivos de *Dunaliella* sp., se tomó 1 mL de cultivo y se adicionaron 12.5 µL de Rojo Nilo en acetona (0.1 mg mL⁻¹). Se mezcló y se incubó 10 min a 37° C en la oscuridad [160].

Separación de las microalgas del agua

La separación de las microalgas del medio de cultivo se realizó mediante una floculación con quitosano, probando diferentes concentraciones de quitosano a diferentes pH para determinar la dosis que logre la mayor remoción de algas del medio de cultivo [161].

Secado de la biomasa

Se llevó a cabo el secado de la biomasa en una estufa a 60° C hasta que esta tenga un peso constante [162].

Extracción de los lípidos de las microalgas

La extracción de lípidos se llevó a cabo con metanol, acetona y etoxi etanol calentando a 60° C y mediante sonicación según la metodología descrita en [163].

Producción de biodiesel

Se llevó a cabo un transesterificación de los lípidos con un catalizador básico (metóxido de sodio), usando una proporción de metanol:aceite de 5:1 a 60° C por 1 h [164].

Calidad de lípidos y del biodiesel

Al aceite se le determinó el valor de acidez mediante el método [165] y el valor de saponificación con el método [166].

Al biodiesel se le determinó la densidad mediante un picnómetro y el valor de acidez mediante el método [167] y el índice de yodo por el método [168].

El perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM con un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer. Se utilizó helio como gas acarreador. La rampa de temperatura utilizada fue la siguiente: se mantuvo el horno a 60° C durante, 3 min, posteriormente se aumentó la temperatura 10° C min⁻¹ hasta llegar a 300° C y se mantuvo esa temperatura durante 5 min [169].

El estándar utilizado fue una mezcla de 37 metil ésteres de ácidos grasos de la marca Supelco®.

Resultados y análisis

Caracterización del agua residual

Se realizó la caracterización del agua residual de un registro donde se mezclaban las aguas provenientes del cultivo de camarón, especies de ornato, alimento vivo (artemias y microalgas), pulpo (Figura 2) y peces marinos (pargo, robalo y corvina) (Figura 3) y se descargaban a una laguna de oxidación, en la Unidad Académica del Sisal de la Universidad Nacional Autónoma de México en Yucatán. En este mismo lugar se realizó la caracterización del agua residual de un estanque para cultivo de camarón (Figura 5) y dos estanques de biofloc (Figura 4) donde se cultivaba alimento vivo para los animales de ornato.



Figura 2. Afluente de la laguna 1 y 2 provenientes del cultivo de pulpo, camarón, especies de ornato, alimento vivo y peces marinos.



Figura 3. Afluente de la laguna 3 proveniente del cultivo de peces marinos.



Figura 4. Cultivo de anfípodos en biofloc.



Figura 5. Cultivo de camarón en bio-floc.

En la caracterización del agua residual se midió oxígeno disuelto, conductividad, sólidos totales disueltos, salinidad, pH, potencial redox, nitratos, nitritos, amonio, fosfatos y DQO (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de aguas residuales provenientes de diversos cultivos de organismos marinos en la Unidad Académica del Sisal de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Día	Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	Conductividad (μS cm ⁻¹)	Sólidos Totales Disueltos (mg L ⁻¹)	Salinidad (ups)	pH	Potencial RedOx	Nitratos (mg L ⁻¹)	Nitritos (mg L ⁻¹)	Amonio (mg L ⁻¹)	Orto-fosfatos (mg L ⁻¹)	DQO (mgO ₂ L ⁻¹)
Afluente laguna 1											
07/09/2015	5.9	59574	35490	36.17	8.32	+	20.97	0.46 ± 0.05	ND*	5.13 ± 0.67	86.5
08/09/2015	4.1	58542	35555	36.1	8.15	+	19.66	0.34 ± 0.12	ND*	7.79 ± 4.93	52
09/09/2015	3.1	56877	35360	35.95	7.92	+	19.72	0.33 ± 0.11	ND*	0.72 ± 0.71	75
10/09/2015	3.5	57166	36008	35.75	8.07	+	19.69	0.37 ± 0.07	ND*	3.39 ± 1.03	57.5
Afluente laguna 2											
07/09/2015	8.6	60639	35590	36.12	8.65	+	20.16	0.90 ± 0.18	ND*	5.54 ± 4.67	77.5
08/09/2015	3.9	57320	35295	35.84	8.01	+	11.05	0.26 ± 0.24	ND*	17.24 ± 3.03	75.5
09/09/2015	3.9	57030	35360	35.92	7.99	+	19.54	0.29 ± 0.02	ND*	ND	56.5
10/09/2015	3.7	56284	34951	35.68	8.13	+	17.23	0.31 ± 0.05	ND*	3.25 ± 0.97	69.3
Afluente laguna 3											
07/09/2015	6.1	59997	35792	36.13	8.37	+	25.7	3.74 ± 0.66	17.23 ± 1.93	3.59 ± 0.92	184
08/09/2015	4.2	60083	35685	36.25	8.49	+	69.31	15.81 ± 0.24	46.78 ± 5.44	13.25 ± 2.17	330.5
09/09/2015	3.1	57857	35555	36.18	8.27	+	57.17	2.35 ±	33.25 ±	7.31 ±	284

10/09/2015	3.3	58126	35124	35.73	8.33	+	29.77	0.47 0.52 ± 0.19	2.77 23.55 ± 3.45	1.37 2.73 ± 1.07	277
Biofloc 1											
07/09/2015	4.1	50741	30940	30.92	8.59	+	141.16	0.50 ± 0.21	ND*	48.5 ± 2.71	129.5
08/09/2015	3.7	49676	30983	30.98	8.37	+	39.32	0.58 ± 0.16	ND*	19.64 ± 1.88	90.5
09/09/2015	3.7	48913	31070	31.1	8.27	+	93.05	1.28 ± 0.04	ND*	16.2 ± 2.17	104.5
10/09/2015	3.8	47978	30926	31.9	8.31	+	47.26	1.67 ± 0.16	ND*	14.89 ± 1.73	99.5
Biofloc 2											
07/09/2015	3.9	50290	30550	30.46	8.53	+	44.19	0.82 ± 0.12	ND*	18.92 ± 1.12	385.5
08/09/2015	3.8	49125	30530	30.46	8.37	+	101.28	0.73 ± 0.07	ND*	50.19 ± 0.47	375.5
09/09/2015	3.9	48450	30667	30.65	8.27	+	44.19	0.64 ± 0.1	ND*	46.75 ± 1.94	376
10/09/2015	4	49135	30723	30.73	8.29	+	47.59	0.91 ± 0.13	ND*	43.29 ± 1.37	385
Cultivo de camarón											
07/09/2015	3.7	29190	17777	16.76	7.83	+	298.32	41.14 ± 6.11	ND*	21.92 ± 0.9	121.5
08/09/2015	3	55130	33799	34.25	7.54	+	290.83	47.28 ± 3.94	ND*	22.58 ± 0.9	97
09/09/2015	3.7	55676	34710	35.13	7.6	+	236.54	37.38 ± 1.56	ND*	14.57 ± 1.72	139.5
10/09/2015	3.3	55123	35012	35.11	7.71	+	278.36	43.25 ± 4.94	ND*	17.23 ± 1.05	151

*ND: no detectable.

Las variaciones en las concentraciones de nutrientes son altas debido a que se hace un constante recambio de agua, pero hay ocasiones donde se lavan los estanques o se agrega alimento a los mismos y es cuando las concentraciones de nutrientes se elevan.

También se realizó la caracterización del agua de la industria Lamarca (Tabla 5) en donde se cultivan camarones, sin embargo se estaba haciendo el recambio de agua, razón por la cual algunas de las concentraciones de nutrientes obtenidas son bajas.

Tabla 5. Caracterización de aguas residuales del cultivo de camarón de la empresa Lamarca.

	Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	Conductividad (μS cm ⁻¹)	Sólidos Totales Disueltos (mg L ⁻¹)	Salinidad (ups)	pH	Potencial RedOx	Nitratos (mg L ⁻¹)	Nitritos (mg L ⁻¹)	Amonio (mg L ⁻¹)	Orto-fosfatos (mg L ⁻¹)	DQO (mgO ₂ L ⁻¹)
Afluente	4.3	47524	17526	17.4	8.06	+	4.48	ND	ND	ND	ND
Fondo	2.9	57891	39251	17.35	8.19	+	17.913	ND	ND	ND	118.25
Efluente	5.1	59321	37152	17.77	8.33	+	14.231	ND	32.55 ± 5.54	ND	68.75
Estanque	6.5	58624	35261	17.65	8.07	+	13.981	ND	ND	ND	52.25

*ND: no detectable.

Se obtuvo un promedio de la concentración de nutrientes en la caracterización de cada una de las diferentes aguas residuales, hecha en la unidad del Sisal de la UNAM, para obtener la concentración de nutrientes en el agua residual sintética. Se obtuvieron las siguientes concentraciones de nutrientes: 45 mg L⁻¹ de nitratos, 10 mg L⁻¹ de nitritos, 30 mg L⁻¹ de amonio, 17 mg L⁻¹ de ortofosfatos y 270 mg O₂ L⁻¹ de DQO.

Según las características descritas en [170], por el contenido de DQO el agua sería de baja contaminación, sin embargo por el contenido de ortofosfatos y de nitrógeno se catalogaría como un agua fuertemente contaminada.

También se obtuvieron otros parámetros como el pH que se puede observar que en general está alrededor de 8, los sólidos totales disueltos con un promedio de 33060.5 mg L⁻¹, la salinidad que en promedio estuvo en 33.3 ups y el potencial RedOx siempre positivo indicando un ambiente aerobio, lo que puede verse por los valores de oxígeno disuelto que siempre fueron superiores a 3 mg L⁻¹.

Densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos (DFFFA)

Durante la estancia en la Unidad Académica del Sisal, se determinó la DFFFA en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes horas del día (Tabla 6).

Tabla 6. DFFFA en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes horas del día (geoposicionamiento de la Unidad Académica del Sisal: 21°09'52.3"N 90°02'54.1"O).

Fecha	Hora del día										
	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00
	Ángulo de 90°										
07/09/2015		977			2047		2013		1411	931.7	437.5
08/09/2015	481.7		1918	1035	521.3		647.7		1657		170.33
09/09/2015		865.3			848.5	989.7	1792.6	1313.7	1056	833.3	17.86
10/09/2015		889.5		1903	2077	2173	2065	1733.6		1055.9	
11/09/2015		907.3		1959	2124	2205	2147	1849.7		1199.1	
	Ángulo del Sol										
07/09/2015		1371.3			2197		2169		1972	1669.3	1073.3
08/09/2015	1289.9		2250	276.3	573.7		713.7		2157		125.69
09/09/2015		1233.7			2317	1007.3	1973.9	1422.7	1053	827.1	13.7
10/09/2015		1300.7		2125	2173	2199	2273	2137		1777.1	
11/09/2015		1307.2		2197	2233	2277	2329	2220		1877.3	

En los días 8 y 9 se puede ver que las irradiaciones son más bajas que los demás días debido a que estos días estuvo nublado.

Como se puede observar en la Tabla 6 desde las 10:00 de la mañana hasta las 16:00 de la tarde la DFFFA es cercana a los 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En las mañanas entre las 8:00 y las 10:00 y en las tardes entre las 16:00 y las 17:00 la DFFFA es cercana a los 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y al amanecer y al atardecer la DFFFA es cercana a los 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Incluso en los

días nublados durante el día se tuvieron DFFFA cercanas a los $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en la mañana y en la tarde cercanas a los $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por estas razones se seleccionaron estas tres DFFFA para los experimentos.

Cultivo de *Tetraselmis* sp.

El cultivo de esta microalga tuvo una duración de 13 días, tiempo en el cual alcanzó una fase de muerte donde la biomasa seca comenzó a reducirse.



Figura 6. Fotografía de *Tetraselmis* sp.

El pH, el oxígeno disuelto y la temperatura de los cultivos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. pH, oxígeno disuelto y temperatura de los cultivos de *Tetraselmis* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	1	4	5	6	7	8	11	12	13
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	pH									
900	7.39	7.83	7.66	7.61	7.77	7.84	7.87	7.81	7.81	7.82
	7.5	7.74	7.64	7.62	7.58	7.61	7.7	7.62	7.65	7.61
	7.49	8.01	8.1	8.04	8.14	8.53	8.42	8.19	8.31	8.27
Promedio	7.46	7.86	7.80	7.76	7.83	7.99	8.00	7.87	7.92	7.90
Desviación estándar	0.06	0.14	0.26	0.25	0.28	0.48	0.38	0.29	0.34	0.34
1500	7.51	7.6	7.64	7.67	7.6	7.74	7.77	7.73	7.66	7.66
	7.5	7.62	7.63	7.68	7.64	7.77	7.79	7.66	7.69	7.66
	7.48	7.61	7.61	7.65	7.64	7.75	7.7	7.47	7.67	7.62
Promedio	7.50	7.61	7.63	7.67	7.63	7.75	7.75	7.62	7.67	7.65
Desviación estándar	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.13	0.02	0.02
2000	7.48	7.55	7.53	7.59	7.59	7.65	7.73	7.63	7.61	7.53
	7.51	7.65	7.62	7.67	7.58	7.64	7.73	7.58	7.65	7.57
	7.52	7.65	7.63	7.63	7.61	7.64	7.71	7.61	7.64	7.58
Promedio	7.50	7.62	7.59	7.63	7.59	7.64	7.72	7.61	7.63	7.56
Desviación estándar	0.02	0.06	0.06	0.04	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03
Oxígeno Disuelto (mg L^{-1})										
900	5.67	6.07	5.04	6.12	4.90	5.06	5.23	5.84	5.32	4.89
	5.88	5.09	6.23	5.86	5.30	4.89	4.92	6.36	5.42	5.50
	6.11	6.20	5.94	5.24	4.93	4.99	6.09	4.94	6.35	5.47
Promedio	5.89	5.79	5.74	5.74	5.04	4.98	5.42	5.71	5.70	5.29
Desviación estándar	0.22	0.61	0.62	0.45	0.22	0.08	0.60	0.72	0.57	0.35
1500	5.65	6.08	5.39	5.87	5.89	5.24	4.92	6.03	5.06	5.82
	6.01	5.11	5.14	5.46	5.47	4.99	5.29	5.05	5.75	6.02
	6.14	5.16	6.37	6.18	5.35	6.08	6.27	6.37	5.78	5.07

Promedio	5.93	5.45	5.64	5.83	5.57	5.44	5.50	5.82	5.53	5.64
Desviación estándar	0.25	0.55	0.65	0.36	0.28	0.57	0.70	0.68	0.41	0.50
2000	6.23	6.26	5.15	4.88	4.94	6.17	6.09	5.50	5.61	6.12
	5.49	6.03	4.88	5.74	5.56	5.04	5.84	5.20	5.83	5.77
	5.80	5.20	6.26	6.07	5.26	5.91	5.54	5.64	5.34	6.38
Promedio	5.84	5.83	5.43	5.56	5.25	5.71	5.82	5.45	5.59	6.09
Desviación estándar	0.38	0.56	0.73	0.61	0.31	0.60	0.28	0.22	0.25	0.31
Temperatura (°C)										
Promedio	30.5	29.8	28.5	24.0	25.0	22.5	22.5	25.0	27.5	27.5
Desviación estándar	4.9	4.6	6.9	5.7	4.6	7.8	7.8	8.5	6.4	7.8

En la Tabla 8 se muestra el crecimiento de la microalga tanto en biomasa seca como la absorbancia del cultivo a 680 nm, además del contenido de lípidos en el cultivo en las 3 diferentes DFFFA. A partir del contenido de biomasa en el cultivo y de la cantidad de lípidos en el mismo, se calculó el contenido de lípidos en la biomasa como mg de lípidos g⁻¹ de biomasa.

Tabla 8. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	1	4	5	6	7	8	11	12	13
DFFFA (μmol m⁻² s⁻¹)	Biomasa seca (g L⁻¹)									
900	0.2405	0.3582	0.7552	0.9524	1.0667	1.1935	1.3267	1.3053	1.3853	1.3753
	0.2262	0.2806	0.8012	0.9210	1.0286	1.1055	1.3894	1.3100	1.3000	1.2790
	0.1881	0.3522	0.8036	0.9210	1.0661	1.1835	1.3887	1.3629	1.3229	1.3099
Promedio	0.2183	0.3303	0.7867	0.9315	1.0538	1.1608	1.3683	1.3260	1.3360	1.3214
Desviación estándar	0.0271	0.0432	0.0273	0.0181	0.0218	0.0482	0.0360	0.0320	0.0441	0.0492
1500	0.2548	0.3403	0.7872	0.8840	0.9722	1.0333	1.1398	1.1280	1.1280	1.1780
	0.1833	0.3358	0.8020	0.8774	0.9526	1.0776	1.1371	1.1298	1.1232	1.1123
	0.2429	0.3925	0.7955	0.8523	0.9929	1.0048	1.1358	1.1211	1.1211	1.1991
Promedio	0.2270	0.3562	0.7949	0.8712	0.9726	1.0385	1.1376	1.1263	1.1241	1.1631
Desviación estándar	0.0383	0.0315	0.0074	0.0168	0.0202	0.0367	0.0020	0.0046	0.0035	0.0453
2000	0.2925	0.3388	0.7244	0.7916	0.8797	0.9206	1.0350	1.0140	1.0140	0.9240

	0.2403	0.3657	0.6358	0.8714	0.8905	0.9257	1.0612	1.0421	1.0121	0.8821
	0.2493	0.3925	0.6299	0.8214	0.8991	0.9286	1.0119	1.0140	1.0940	0.9040
Promedio	0.2607	0.3657	0.6634	0.8282	0.8898	0.9250	1.0361	1.0234	1.0400	0.9034
Desviación estándar	0.0279	0.0269	0.0530	0.0403	0.0097	0.0040	0.0247	0.0162	0.0468	0.0210
Absorbancia 680 nm										
	0.134	0.218	0.466	0.783	0.56	0.86	0.971	1.133	1.175	1.147
900	0.103	0.206	0.531	0.813	0.659	0.836	0.955	0.941	1.031	1.133
	0.102	0.173	0.271	0.397	0.457	0.606	0.659	0.936	0.946	0.971
Promedio	0.113	0.199	0.423	0.664	0.559	0.767	0.862	1.003	1.051	1.084
Desviación estándar	0.018	0.023	0.135	0.232	0.101	0.140	0.176	0.112	0.116	0.098
	0.107	0.206	0.515	0.693	0.574	0.907	0.891	1.137	0.975	1.093
1500	0.106	0.191	0.493	0.643	0.637	0.842	0.953	1.117	1.081	1.125
	0.108	0.186	0.521	0.673	0.663	0.947	0.921	1.109	1.059	0.983
Promedio	0.107	0.194	0.510	0.670	0.625	0.899	0.922	1.121	1.038	1.067
Desviación estándar	0.001	0.010	0.015	0.025	0.046	0.053	0.031	0.014	0.056	0.074
	0.088	0.191	0.626	0.787	0.692	0.913	0.99	1.127	1.049	0.961
2000	0.089	0.193	0.479	0.703	0.507	0.78	0.873	0.997	0.993	0.899
	0.087	0.186	0.491	0.651	0.504	0.827	0.879	1.115	0.983	1.105
Promedio	0.088	0.190	0.532	0.714	0.568	0.840	0.914	1.080	1.008	0.988
Desviación estándar	0.001	0.004	0.082	0.069	0.108	0.067	0.066	0.072	0.036	0.106
Lípidos (mg L⁻¹)										
	3.88	6.30	22.12	46.79	43.91	47.39	37.97	71.57	79.90	78.87
900	4.21	8.15	23.81	46.91	40.17	55.01	44.42	55.34	88.34	75.38
	4.31	7.59	22.61	45.97	45.45	44.28	37.67	49.81	78.59	86.49
Promedio	4.13	7.35	22.85	46.56	43.18	48.89	40.02	58.91	82.28	80.25
Desviación estándar	0.22	0.95	0.87	0.51	2.72	5.52	3.81	11.31	5.29	5.68
	4.95	8.70	23.81	42.60	38.16	60.76	30.26	79.06	70.64	103.16
1500	5.28	6.95	25.20	41.08	35.08	56.48	35.92	81.20	83.40	110.56
	3.46	10.54	26.78	37.83	37.22	62.24	40.17	68.54	85.46	113.65

Promedio	4.56	8.73	25.26	40.51	36.82	59.83	35.45	76.26	79.83	109.12
Desviación estándar	0.97	1.80	1.49	2.44	1.58	2.99	4.97	6.78	8.03	5.39
	2.28	7.87	31.24	52.37	41.10	66.78	41.59	79.41	92.25	82.17
2000	1.96	5.75	25.79	36.09	25.99	51.00	49.14	63.90	87.93	82.99
	2.17	7.96	23.11	35.63	22.24	53.54	34.98	84.59	67.76	88.55
Promedio	2.14	7.19	26.71	41.36	29.78	57.11	41.90	75.97	82.65	84.57
Desviación estándar	0.16	1.25	4.14	9.54	9.98	8.47	7.09	10.77	13.07	3.47
Lípidos (mg g⁻¹)										
	16.15	17.59	29.29	49.13	41.17	39.71	30.95	54.83	57.68	57.35
900	18.59	29.03	29.72	50.93	39.05	49.76	37.35	42.24	67.95	58.93
	22.93	21.55	28.14	49.91	42.64	37.41	29.93	36.55	59.40	66.03
Promedio	19.22	22.72	29.05	49.99	40.95	42.29	32.74	44.54	61.68	60.77
Desviación estándar	3.43	5.81	0.82	0.90	1.80	6.57	4.02	9.36	5.50	4.62
	19.45	25.56	30.24	48.19	39.25	58.80	28.18	70.09	62.63	87.57
1500	28.77	20.68	31.42	46.82	36.83	52.42	32.26	71.87	74.25	99.40
	14.23	26.86	33.66	44.39	37.49	61.94	38.21	61.14	76.23	94.78
Promedio	20.82	24.37	31.77	46.47	37.86	57.72	32.88	67.70	71.04	93.92
Desviación estándar	7.37	3.26	1.74	1.92	1.25	4.85	5.05	5.75	7.35	5.96
	7.79	23.22	43.12	66.16	46.72	72.54	42.72	78.32	90.97	88.92
2000	8.15	15.72	40.56	41.42	29.18	55.09	51.13	61.32	86.88	94.09
	8.71	20.28	36.70	43.37	24.74	57.66	36.10	83.42	61.94	97.95
Promedio	8.22	19.74	40.13	50.32	33.55	61.76	43.31	74.35	79.93	93.65
Desviación estándar	0.47	3.78	3.23	13.76	11.62	9.42	7.53	11.57	15.72	4.53

Los promedios de la biomasa seca de la Tabla 8 y los de contenido de lípidos de la para cada una de las DFFFA fueron graficados para ver la curva de crecimiento de la microalga y el cambio en el contenido de lípidos de la misma. Así mismo fueron graficados los contenidos de lípidos en la biomasa.

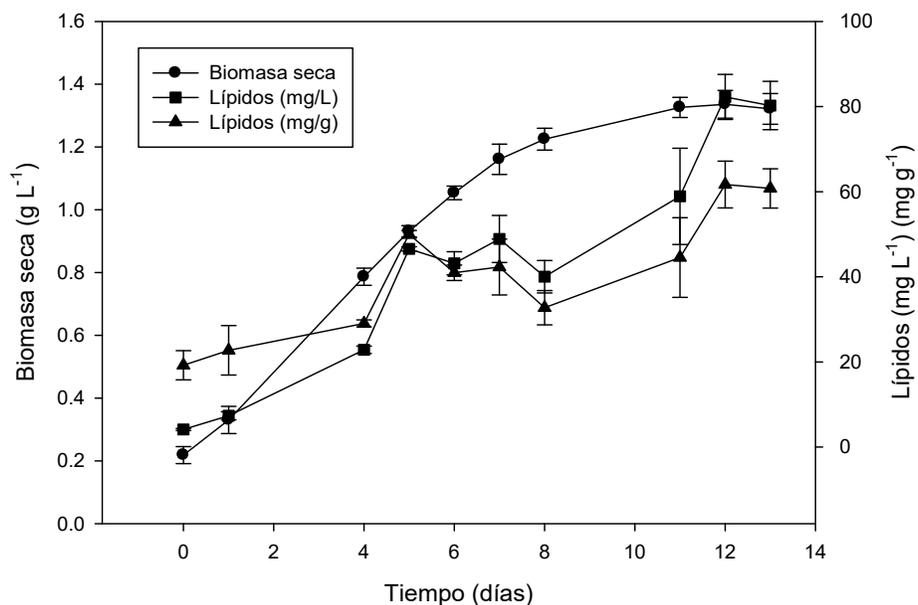


Figura 7. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

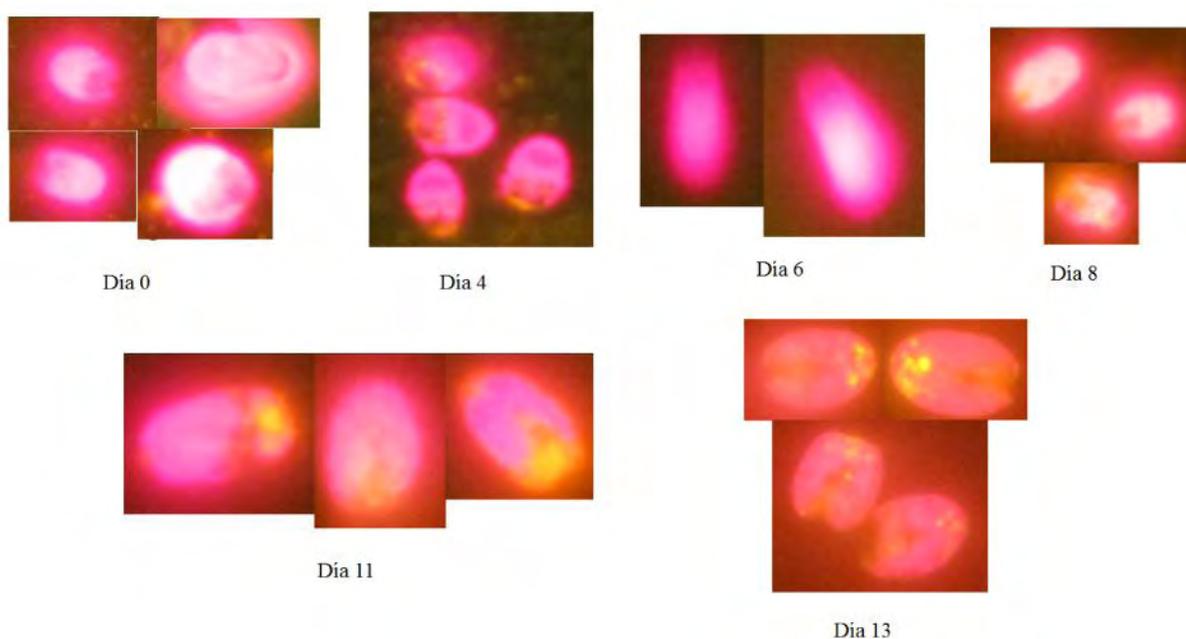


Figura 8. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de *Tetraselmis* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

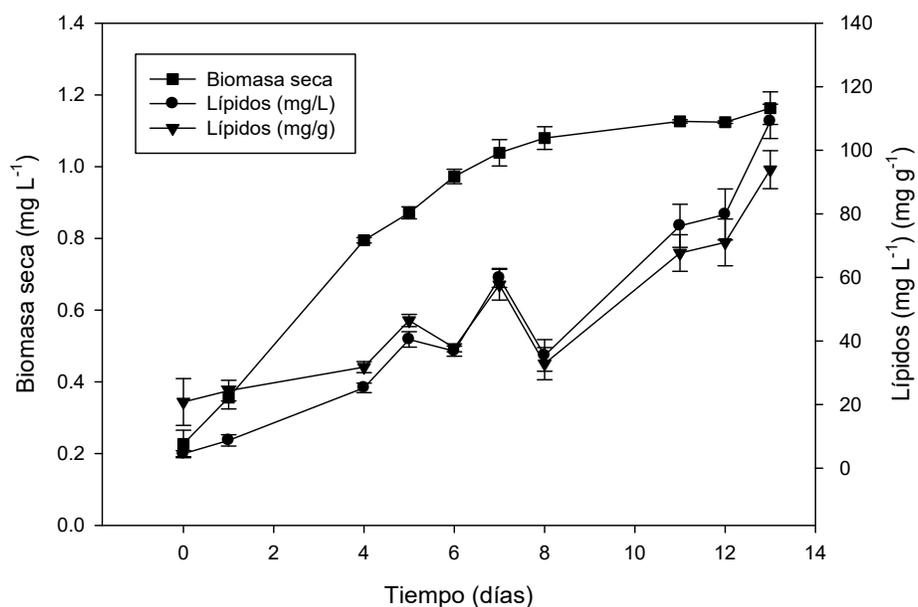


Figura 9. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

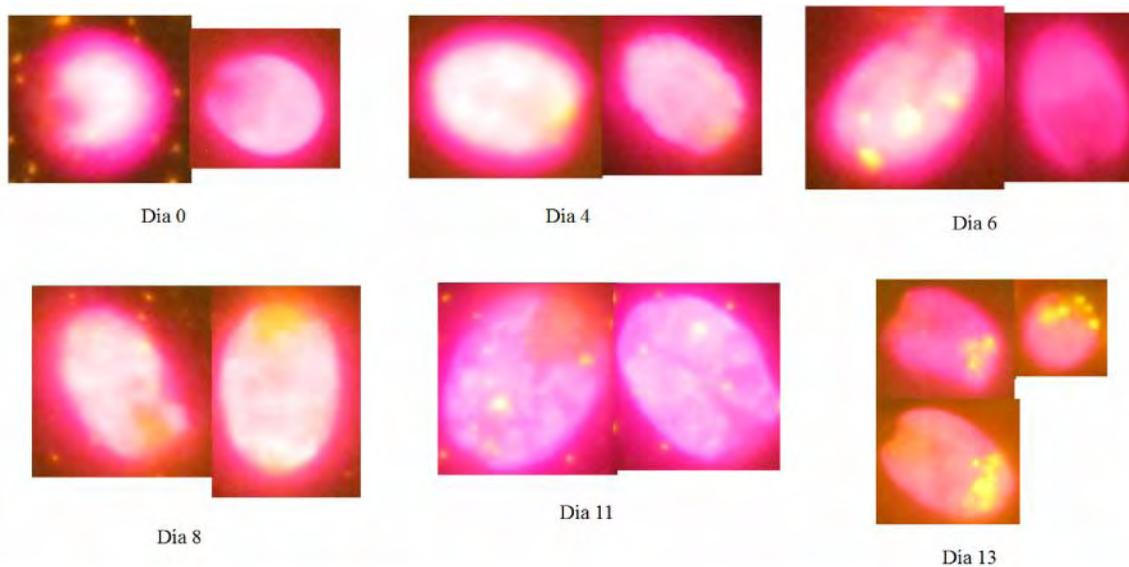


Figura 10. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de *Tetraselmis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

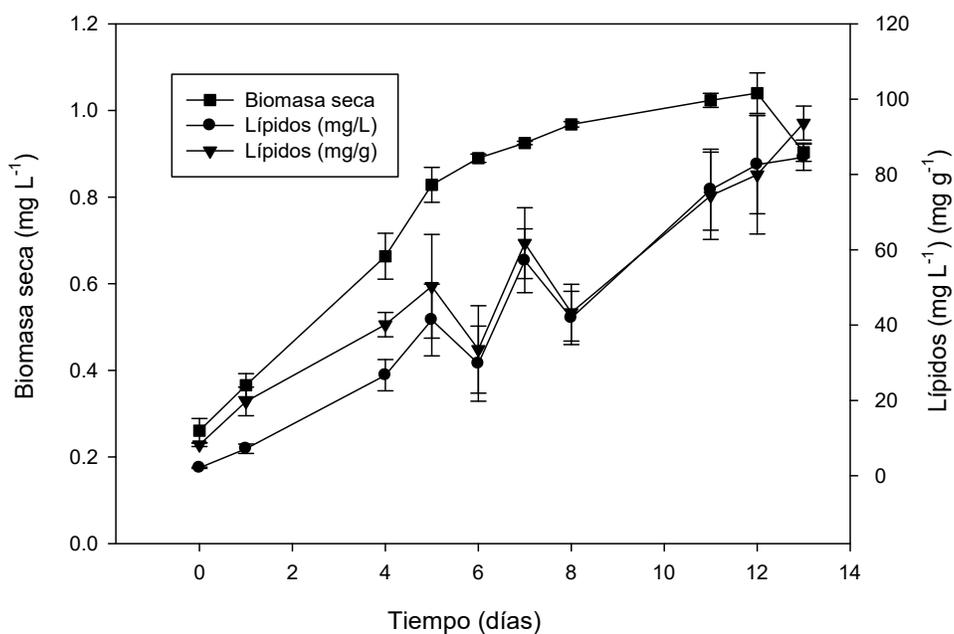


Figura 11. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

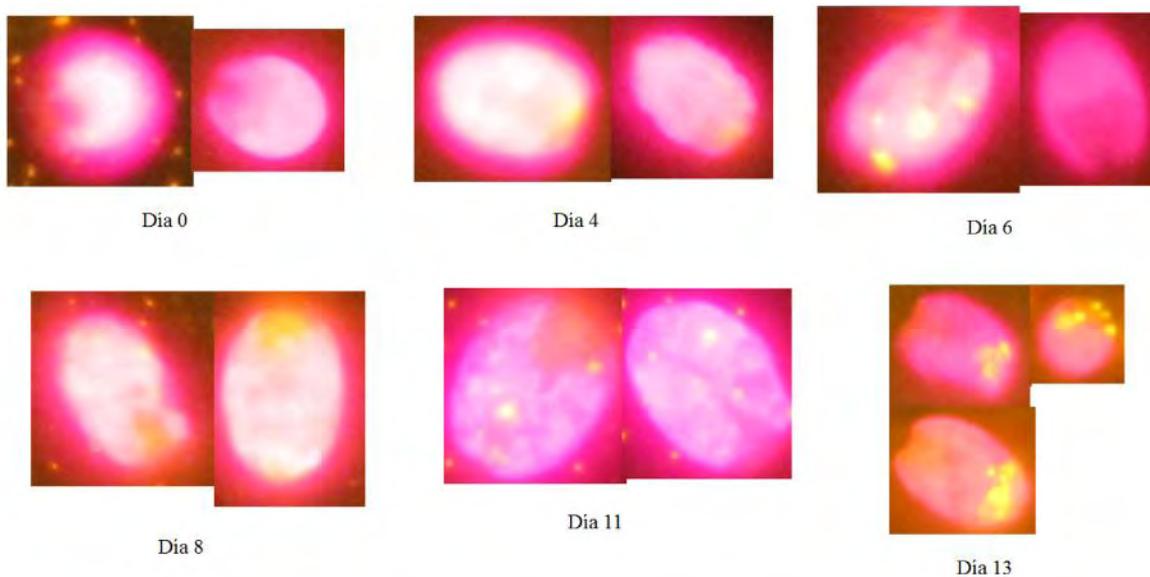


Figura 12. Tinción de Rojo Nilo para el cultivo de *Tetraselmis* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los cultivos a las diferentes DFFFA (900 , 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se puede observar que la fase estacionaria se alcanza alrededor del día 8 (Figura 7, Figura 9 y Figura 11), que es el día en el cual se observa un aumento en el contenido de lípidos del cultivo, llegando a

su máximo en el día 13, tiempo en el cual se detuvo el cultivo debido a que la microalga llegó a su fase de muerte y empezó a haber una pérdida de biomasa en el cultivo. El comportamiento es muy similar tanto para el contenido de lípidos en el cultivo como para el contenido de lípidos en la biomasa. Mediante las imágenes de tinción con Rojo Nilo (Figura 8, Figura 10 y Figura 12) puede observarse que a partir del día 6 comienza a haber una pequeña cantidad de cuerpos lipídicos dentro del alga, misma que comienza a aumentar el día 8 y que continúa su aumento hasta llegar al día 13 del cultivo.

Para poder realizar la comparación del contenido de biomasa y lípidos a las distintas DFFFA, se graficaron la biomas y lípidos en el cultivo a las diferentes DFFFA por separado.

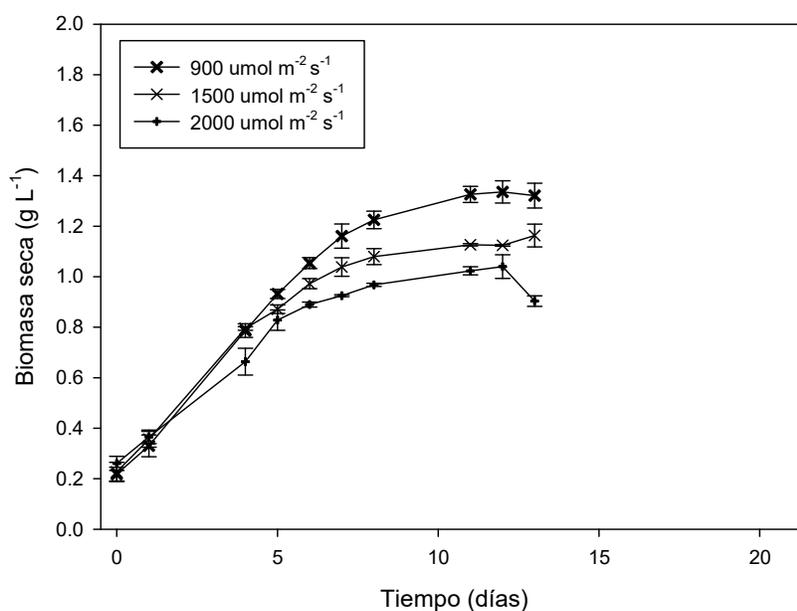


Figura 13. Contenido de biomasa en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a las diferentes DFFFA.

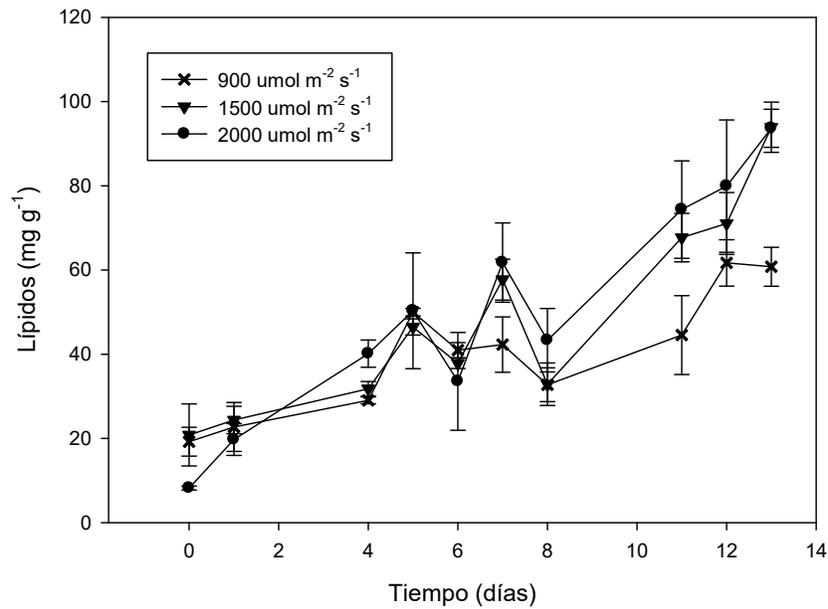


Figura 14. Contenido de lípidos en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a las diferentes DFFFA.

En la Figura 13 se puede observar que el mayor contenido de biomasa se obtuvo para los cultivos a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, el mayor contenido de lípidos se obtuvo para los cultivos a 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 14).

Con los resultados de la Tabla 8 se calculó la productividad de biomasa en el día 8 que es cuando acaba la fase logarítmica de crecimiento, la tasa de crecimiento específico y la productividad de lípidos, datos que se presentan en la Tabla 9. Con estos resultados se puede ver que la microalga sometida a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiene la mayor productividad de biomasa, la mayor productividad de lípidos se alcanzó con la DFFFA de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 9. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de *Tetraselmis* sp- a diferentes DFFFA.

DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Productividad de biomasa	Tasa de crecimiento específico	Productividad de lípidos
900	134.1 mg L ⁻¹ día ⁻¹	0.305 día ⁻¹	23.03 mg L ⁻¹ día ⁻¹
1500	128.0 mg L ⁻¹ día ⁻¹	0.298 día ⁻¹	31.29 mg L ⁻¹ día ⁻¹
2000	103.8 mg L ⁻¹ día ⁻¹	0.238 día ⁻¹	21.52 mg L ⁻¹ día ⁻¹

Al realizar el análisis estadístico con la concentración de nitrógeno total como factor se obtiene que esta si es significativa ($p < 0.05$) para la productividad de lípidos en el cultivo de esta microalga. Sin embargo para la DFFFA se obtiene que esta no es significativa para la productividad de lípidos, esto puede deberse a que en la fase estacionaria de cultivo ya hay una densidad celular alta en el cultivo por lo que únicamente las células en la superficie del cultivo están expuestas a la luz y al estar en agitación no hay un efecto de la luz.

Se realizó la caracterización del agua residual durante todo el cultivo para determinar el contenido de nutrientes en la misma y ver cómo afecta esto al contenido de lípidos y biomasa en el cultivo, primero se muestra el contenido de nitratos, nitritos y nitrógeno amoniacal, además del nitrógeno total que es la suma de las 3 formas de nitrógeno y también se muestra el contenido de ortofosfatos y DQO (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de *Tetraselmis* sp.

Día	0	1	4	5	6	7	8	11	12	13
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})										
					Nitritos (mg L^{-1})					
	6.57	7.60	6.22	13.54	9.45	9.74	8.42	<0.10	<0.10	<0.10
900	6.86	7.96	7.14	10.73	7.77	6.87	5.41	<0.10	<0.10	<0.10
	7.02	7.79	7.26	10.67	9.34	11.76	5.57	<0.10	<0.10	<0.10
Promedio	6.82	7.78	6.87	11.65	8.85	9.46	6.47			
Desviación estándar	0.23	0.18	0.57	1.64	0.94	2.46	1.69			
	7.02	7.34	6.61	11.35	8.22	7.61	4.64	<0.10	<0.10	<0.10
1500	7.64	8.60	7.87	12.96	10.52	10.31	8.24	<0.10	<0.10	<0.10
	6.57	7.34	7.11	11.90	8.55	7.89	5.69	<0.10	<0.10	<0.10
Promedio	7.07	7.76	7.20	12.07	9.10	8.60	6.19			
Desviación estándar	0.54	0.73	0.63	0.82	1.24	1.48	1.85			
	7.03	6.86	6.72	8.73	5.29	1.36	1.27	<0.10	<0.10	<0.10
2000	7.34	7.99	7.19	11.70	8.77	9.26	7.82	<0.10	<0.10	<0.10
	7.02	7.70	7.45	12.41	9.97	8.63	0.80	<0.10	<0.10	<0.10
Promedio	7.13	7.52	7.12	10.95	8.01	6.42	3.29			
Desviación estándar	0.19	0.58	0.37	1.95	2.43	4.39	3.93			
					Nitratos (mg L^{-1})					
900	43.99	36.34	46.72	39.57	38.58	27.21	13.92	<1.00	<1.00	<1.00

	43.87	31.21	47.85	37.61	27.65	16.71	6.01	<1.00	<1.00	<1.00
	43.03	34.93	47.11	41.56	36.65	29.12	19.88	<1.00	<1.00	<1.00
Promedio	43.63	34.16	47.23	39.58	34.29	24.34	13.27			
Desviación estándar	0.52	2.65	0.57	1.98	5.84	6.68	6.96			
	44.56	42.06	46.67	43.98	23.53	10.93	1.47	<1.00	<1.00	<1.00
1500	48.08	40.54	49.68	48.68	15.78	9.60	2.91	<1.00	<1.00	<1.00
	43.53	34.58	64.75	43.60	27.38	12.79	1.00	<1.00	<1.00	<1.00
Promedio	45.39	39.06	53.70	45.42	22.23	11.11	1.79			
Desviación estándar	2.38	3.95	9.69	2.82	5.91	1.60	<1.00			
	43.07	36.77	45.03	20.86	2.44	2.18	1.71	<1.00	<1.00	<1.00
2000	46.45	40.24	36.72	45.16	22.39	13.12	9.20	<1.00	<1.00	<1.00
	49.46	49.65	52.48	45.82	25.71	17.84	11.11	<1.00	<1.00	<1.00
Promedio	46.33	42.22	44.74	37.28	16.84	11.05	7.34			
Desviación estándar	3.20	6.66	7.89	14.22	12.59	8.03	4.97			
	Nitrógeno amoniacal (mg L⁻¹)									
	27.77	17.69	5.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
900	29.62	22.86	1.48	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	29.53	19.44	6.99	0.74	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	28.97	20.00	4.66	0.74						
Desviación estándar	1.05	2.63	2.85							
	26.72	18.63	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
1500	28.98	20.38	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	30.88	16.76	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	28.86	18.59								
Desviación estándar	2.08	1.81								

	29.84	13.82	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
2000	27.46	18.92	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	29.31	18.63	0.59	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	28.87	17.12	0.59							
Desviación estándar	1.25	2.87								
Nitrógeno total (mg L⁻¹)										
	78.32	61.64	58.44	53.11	48.03	36.95	22.34	1.60	1.60	1.60
900	80.35	62.03	56.46	48.34	35.42	23.57	11.43	1.60	1.60	1.60
	79.58	62.16	61.35	52.97	45.99	40.88	25.45	1.60	1.60	1.60
Promedio	79.42	61.94	58.75	51.47	43.15	33.80	19.74	1.60	1.60	1.60
Desviación estándar	1.02	0.27	2.46	2.71	6.77	9.07	7.36	0.00	0.00	0.00
	78.30	68.03	53.28	55.33	31.76	18.55	6.11	1.60	1.60	1.60
1500	84.70	69.52	57.55	61.64	26.30	19.91	11.15	1.60	1.60	1.60
	80.98	58.68	71.86	55.50	35.93	20.68	6.69	1.60	1.60	1.60
Promedio	81.33	65.41	60.90	57.49	31.33	19.71	7.98	1.60	1.60	1.60
Desviación estándar	3.21	5.88	9.73	3.59	4.83	1.08	2.76	0.00	0.00	0.00
	79.94	57.45	51.75	29.59	7.72	3.55	2.97	1.60	1.60	1.60
2000	81.26	67.15	43.91	56.86	31.16	22.38	17.02	1.60	1.60	1.60
	85.78	75.98	60.52	58.23	35.68	26.47	11.90	1.60	1.60	1.60
Promedio	82.32	66.86	52.06	48.23	24.85	17.47	10.63	1.60	1.60	1.60
Desviación estándar	3.07	9.27	8.31	16.15	15.01	12.23	7.11	0.00	0.00	0.00
Ortofosfatos (mg L⁻¹)										
	17.57	15.57	12.73	8.92	7.31	4.85	3.32	1.15	0.56	<0.50
900	16.99	14.94	12.55	7.93	6.28	4.56	3.40	0.99	0.86	<0.50
	16.75	15.74	10.77	9.60	7.43	5.06	2.89	1.35	0.82	<0.50
Promedio	17.10	15.41	12.02	8.82	7.01	4.82	3.20	1.16	0.75	

Desviación estándar	0.42	0.42	1.08	0.84	0.63	0.25	0.27	0.18	0.16	
1500	16.64	13.83	12.62	8.93	7.76	4.92	2.66	1.20	0.67	<0.50
	16.46	14.51	10.93	8.17	7.02	4.90	2.66	1.03	0.81	<0.50
	17.89	13.26	11.21	9.18	5.75	5.20	2.58	0.95	0.59	<0.50
Promedio	17.00	13.87	11.59	8.76	6.84	5.01	2.63	1.06	0.69	
Desviación estándar	0.78	0.62	0.90	0.53	1.01	0.17	0.04	0.13	0.11	
2000	17.64	13.48	10.12	8.57	7.26	4.75	3.30	1.24	0.52	<0.50
	16.34	14.84	11.81	8.06	5.54	4.52	3.62	1.73	0.84	<0.50
	16.99	14.59	12.72	8.13	7.77	4.86	2.78	1.02	0.85	<0.50
Promedio	16.99	14.31	11.55	8.26	6.86	4.71	3.23	1.33	0.74	
Desviación estándar	0.65	0.73	1.32	0.28	1.17	0.17	0.43	0.36	0.19	
Demanda Química de Oxígeno (mg O₂ L⁻¹)										
900	270.69	210.51	170.88	134.66	118.96	90.01	72.77	52.90	<50.00	<50.00
	270.13	208.05	178.24	143.47	118.19	94.00	75.10	59.74	<50.00	<50.00
	272.83	200.45	169.55	133.29	115.56	85.87	66.18	57.43	<50.00	<50.00
Promedio	271.22	206.33	172.89	137.14	117.57	89.96	71.35	56.69		
Desviación estándar	1.43	5.24	4.68	5.52	1.78	4.06	4.62	3.48		
1500	260.57	212.05	176.64	134.58	113.04	86.05	72.55	50.88	<50.00	<50.00
	261.09	213.28	174.12	136.13	124.83	85.06	67.69	52.54	<50.00	<50.00
	266.68	201.33	177.33	142.56	117.25	95.25	67.05	50.84	<50.00	<50.00
Promedio	262.78	208.89	176.03	137.76	118.37	88.79	69.09	51.42		
Desviación estándar	3.39	6.57	1.69	4.23	5.98	5.62	3.01	0.97		
2000	263.68	202.53	173.95	142.25	125.34	87.19	77.15	59.86	<50.00	<50.00
	76.85	208.99	179.86	142.55	117.73	90.80	73.75	53.77	<50.00	<50.00
	274.16	199.49	178.65	143.50	118.14	87.55	71.48	50.94	<50.00	<50.00

Promedio	204.90	203.67	177.49	142.77	120.40	88.51	74.13	54.86
Desviación estándar	111.02	4.85	3.12	0.65	4.28	1.99	2.85	4.56

Los datos contenidos en la Tabla 10 se graficaron para ver la disminución en la concentración de nutrientes del medio de cultivo, el nitrógeno se graficó como nitrógeno total.

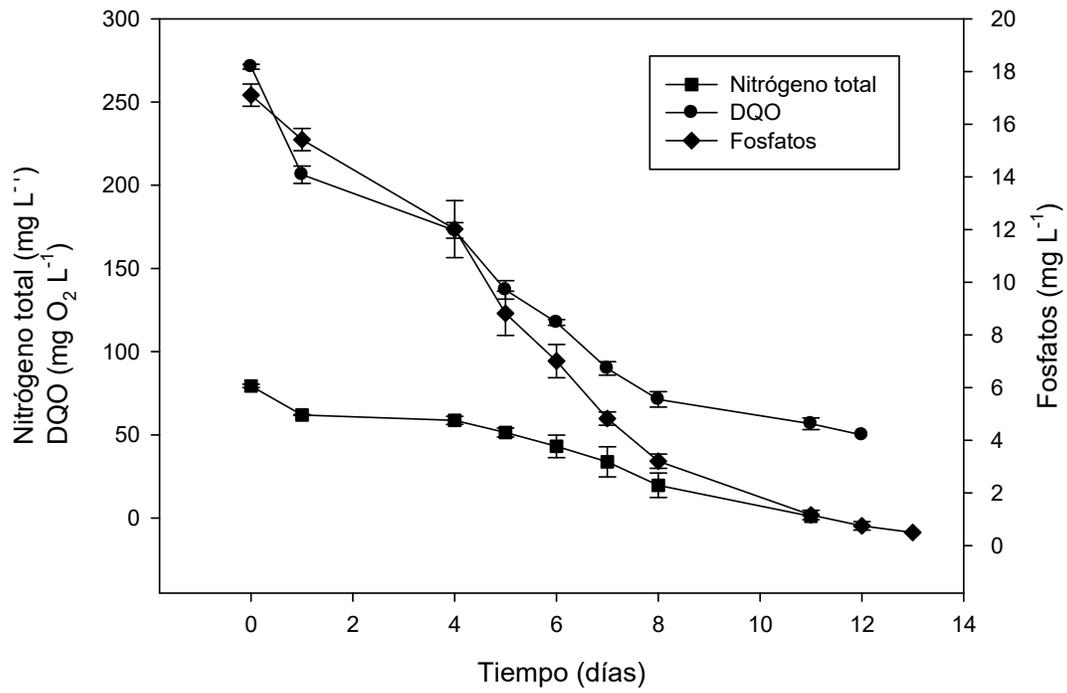


Figura 15. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

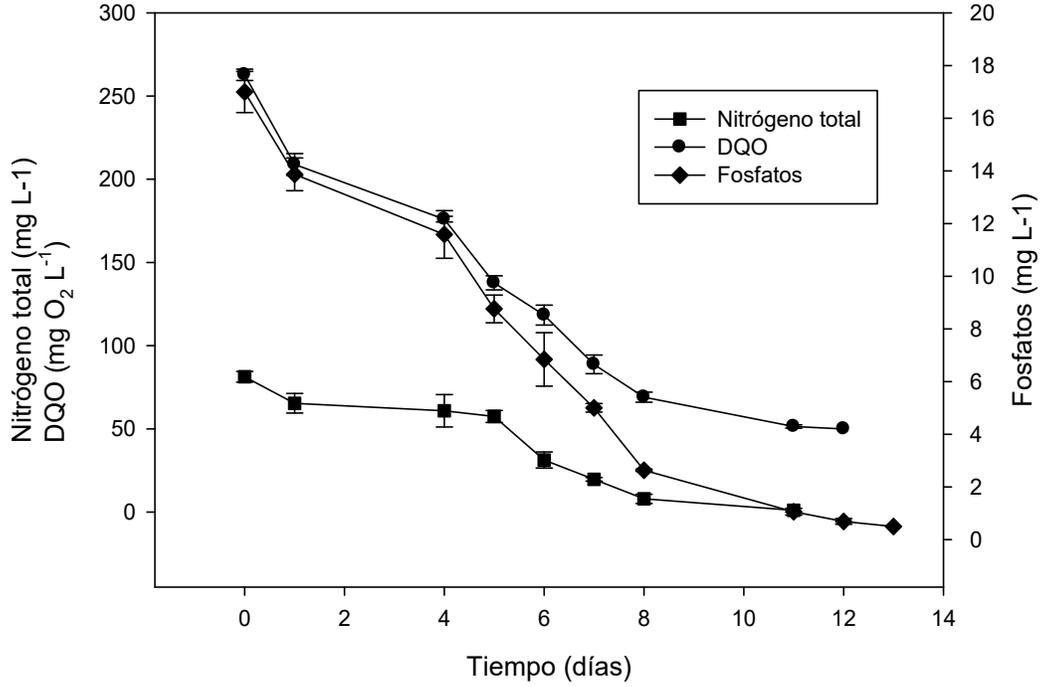


Figura 16. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

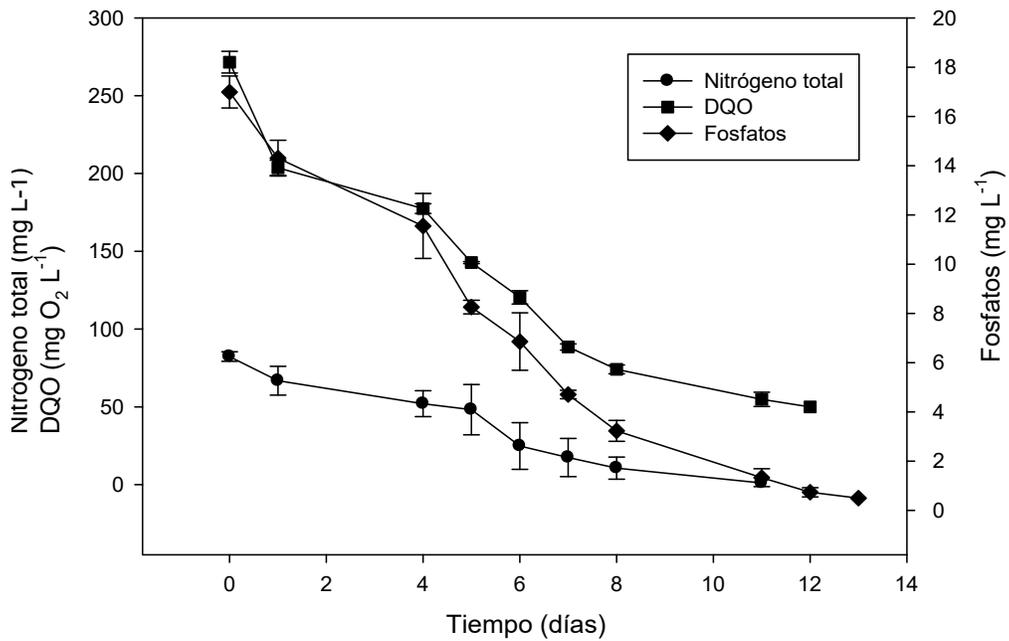


Figura 17. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Tetraselmis* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los cultivos a las 3 diferentes DFFFA (900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se puede observar que a partir del día 7, todos los nutrientes alcanzan concentraciones bajas (Figura 15, Figura 16 y Figura 17), posteriormente en el día 8 cuando hay poca concentración de nutrientes es cuando se alcanza la fase estacionaria de crecimiento y es cuando aumenta la cantidad de lípidos en los cultivos (Figura 14).

En los cultivos para las 3 diferentes DFFFA, la remoción del nitrógeno total fue mayor al 95 %. Para los ortofosfatos la remoción fue de alrededor del 95 % para los cultivos sometidos a las 3 DFFFA. Hubo una remoción de DQO cercana al 80 % para los cultivos a las 3 DFFFA.

Las cinéticas de remoción de los contaminantes para los cultivos a las 3 DFFFA fueron muy similares, siendo la remoción de nitrógeno de alrededor de 7 $\text{mg L}^{-1} \text{ día}$, la de DQO de 20 $\text{mg L}^{-1} \text{ día}$ y la de fósforo cercana a los 1.5 $\text{mg L}^{-1} \text{ día}$.

Se determinó el contenido de clorofila en el medio de cultivo y el contenido de clorofila en la biomasas de las microalgas, estos datos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Contenido de clorofila en el medio de cultivo y en la biomasa de *Tetraselmis sp.*

Día	0	5	7	12
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	6199.7	267.0	480.6	1869.0
900	5579.1	1922.4	801.0	2883.6
	4378.8	2830.2	5019.6	53.4
Promedio	5385.9	1673.2	2100.4	1602.0
Desviación estándar	925.7	1299.6	2533.2	1433.9
	5745.6	694.2	534.0	2029.2
1500	8383.3	1975.8	1014.6	1441.8
	1815.6	1121.8	1762.2	961.2
Promedio	5314.8	1263.9	1103.6	1477.4
Desviación estándar	3305.0	652.5	618.9	534.9
	10733.4	3577.8	1235.0	1281.6
2000	2378.7	1121.4	640.8	2509.8
	3785.1	2136.0	640.8	1762.2
Promedio	5632.4	2278.4	838.9	1851.2
Desviación estándar	4473.2	1234.4	343.1	618.9
Clorofila ($\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa)				
	25778.5	280.3	402.7	1349.2
900	24664.5	2087.3	724.6	2218.2
	23279.1	3073.0	4241.3	40.4
Promedio	24574.0	1813.5	1789.5	1202.6
Desviación estándar	1252.2	1416.3	2129.4	1096.3
	22549.5	785.3	516.8	1798.9
1500	45735.4	2251.9	941.5	1283.7

	7474.7	1316.2	1753.8	857.4
Promedio	25253.2	1451.1	1070.7	1313.3
Desviación estándar	19273.1	742.5	628.5	471.5
	36695.4	4519.7	1341.5	1263.9
2000	9898.9	1286.9	692.2	2479.8
	15182.8	2600.4	690.1	1610.8
Promedio	20592.3	2802.3	907.9	1784.8
Desviación estándar	14193.7	1625.8	375.5	626.4

De la Tabla 11 se puede observar que el contenido de clorofila disminuye con el tiempo, lo cual nos podría dar una idea de que la microalga podría tener un metabolismo mixótrofo debido a que usa el carbono orgánico del medio para crecer al igual que el dióxido de carbono presente en el aire. Aunque la otra razón podría ser que el contenido de nitrógeno disminuye, el cual es necesario para sintetizar la clorofila, lo que podría ser causa de la disminución.

Cultivo de *Dunaliella* sp.

Se realizaron los cultivos de esta microalga en el agua residual sintética con concentraciones de 45 mg L⁻¹ de nitratos, 10 mg L⁻¹ de nitritos, 30 mg L⁻¹ de amonio, 17 mg L⁻¹ de ortofosfatos y 270 mg O₂ L⁻¹ de DQO y a 3 diferentes DFFFA que fueron 2000 μmol m⁻² s⁻¹, 1500 μmol m⁻² s⁻¹ y 900 μmol m⁻² s⁻¹.



Figura 18. Fotografía de *Dunaliella* sp.

El pH, el oxígeno disuelto y la temperatura de los cultivos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. pH, oxígeno disuelto y temperatura de los cultivos de *Dunaliella* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	pH												
900	7.26	7.94	8.04	7.75	7.73	7.69	8.09	7.76	7.71	7.69	7.64	7.78	7.99
	7.28	7.75	7.88	7.54	7.68	7.54	7.83	7.7	7.69	7.72	7.56	7.62	7.67
	7.33	8.35	8.24	8.25	8.11	7.79	7.98	7.78	7.81	7.84	7.9	7.87	7.71
Promedio	7.29	8.01	8.05	7.85	7.84	7.67	7.97	7.75	7.74	7.75	7.70	7.76	7.79
Desviación estándar	0.04	0.31	0.18	0.36	0.24	0.13	0.13	0.04	0.06	0.08	0.18	0.13	0.17
1500	7.31	7.76	7.91	7.64	7.62	8.3	8.44	8.42	8.28	7.97	7.83	7.97	7.97
	7.29	7.88	8.01	7.75	7.8	7.75	7.85	7.8	7.76	7.74	7.6	7.66	7.73
	7.32	7.64	7.79	7.55	7.7	7.62	7.71	7.65	7.64	7.68	7.54	7.57	7.62
Promedio	7.31	7.76	7.90	7.65	7.71	7.89	8.00	7.96	7.89	7.80	7.66	7.73	7.77
Desviación estándar	0.02	0.12	0.11	0.10	0.09	0.36	0.39	0.41	0.34	0.15	0.15	0.21	0.18
2000	7.3	8.32	8.54	7.7	7.71	7.61	7.72	7.62	7.64	7.69	7.5	7.68	7.61
	7.27	8.21	8.33	8.49	7.79	7.68	7.76	7.7	7.68	7.71	7.53	7.67	7.64
	7.28	8.36	8.45	7.92	8.03	7.83	7.81	7.75	7.72	7.74	7.66	7.98	7.63
Promedio	7.28	8.30	8.44	8.04	7.84	7.71	7.76	7.69	7.68	7.71	7.56	7.78	7.63
Desviación estándar	0.02	0.08	0.11	0.41	0.17	0.11	0.05	0.07	0.04	0.03	0.09	0.18	0.02
Oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)													
900	5.86	6.25	5.12	5.69	6.18	5.60	4.93	5.35	4.87	5.68	5.03	5.95	5.50
	5.81	5.93	5.80	6.25	5.46	5.63	5.90	5.37	5.30	5.59	5.07	5.08	6.22
	5.81	6.00	5.96	5.91	5.93	5.00	5.73	5.11	5.25	5.90	4.98	5.64	4.88
Promedio	5.83	6.06	5.63	5.95	5.86	5.41	5.52	5.28	5.14	5.72	5.03	5.55	5.53
Desviación estándar	0.03	0.17	0.45	0.28	0.36	0.36	0.52	0.14	0.23	0.16	0.05	0.44	0.67
1500	5.49	5.91	5.88	6.31	5.44	5.96	4.89	6.24	5.87	5.57	6.21	5.34	0.95

	6.31	5.63	6.05	5.53	5.20	5.05	5.60	6.31	5.57	5.19	6.00	5.50	5.54
	5.85	5.53	5.56	6.17	5.17	4.99	5.55	5.14	5.74	6.08	4.94	5.09	6.08
Promedio	5.88	5.69	5.83	6.00	5.27	5.33	5.35	5.90	5.73	5.62	5.72	5.31	4.19
Desviación estándar	0.41	0.19	0.25	0.42	0.15	0.55	0.40	0.66	0.15	0.45	0.68	0.20	2.82
2000	6.07	6.00	5.92	4.94	5.75	4.90	6.18	5.11	5.06	5.94	5.35	5.99	6.17
	5.28	5.30	6.16	5.14	6.19	6.03	5.19	6.09	5.24	5.82	5.37	5.92	5.13
	5.80	5.93	5.42	5.11	5.55	5.28	4.96	6.17	5.19	5.62	5.79	5.73	4.94
Promedio	5.72	5.74	5.83	5.06	5.83	5.40	5.44	5.79	5.17	5.79	5.50	5.88	5.41
Desviación estándar	0.40	0.38	0.38	0.11	0.33	0.58	0.65	0.59	0.09	0.16	0.25	0.14	0.66
Temperatura (°C)													
Promedio	27	31	31.5	23	26.5	26	31.5	27	30.5	29	27	26.5	28
Desviación estándar	7.07	4.24	4.95	4.24	6.36	9.90	6.36	5.66	10.61	5.66	12.73	9.19	8.49

En la Tabla 13 se muestra el crecimiento de la microalga tanto como biomasa seca como la absorbancia a 680 nm y el contenido de lípidos en el cultivo en las 3 diferentes DFFFA. A partir del contenido de biomasa en el cultivo y de la cantidad de lípidos en el mismo, se calculó el contenido de lípidos en la biomasa como mg de lípidos g⁻¹ de biomasa.

Tabla 13. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18
DFFFA (μmol m⁻² s⁻¹)	Biomasa (g L⁻¹)												
	0.1539	0.2853	0.3471	0.4193	0.5505	0.5897	0.9670	1.0745	1.1863	1.3697	1.3942	1.3742	1.3721
900	0.1535	0.2980	0.3671	0.4418	0.5608	0.6054	0.9703	1.0760	1.1870	1.3601	1.3624	1.3632	1.3633
	0.1548	0.2869	0.3411	0.4103	0.5246	0.5676	0.9679	1.0759	1.1825	1.3599	1.3543	1.3558	1.3490
Promedio	0.1541	0.2901	0.3518	0.4238	0.5453	0.5876	0.9684	1.0755	1.1853	1.3633	1.3703	1.3644	1.3615
Desviación estándar	0.0007	0.0069	0.0136	0.0163	0.0186	0.0190	0.0017	0.0008	0.0024	0.0056	0.0211	0.0093	0.0116
	0.1360	0.2861	0.3586	0.4770	0.5339	0.6387	0.8587	0.9906	1.1800	1.2968	1.2966	1.2974	1.2877
1500	0.1637	0.2826	0.3637	0.4631	0.5763	0.6258	0.8526	0.9722	1.1238	1.2757	1.2713	1.268	1.2631

	0.1364	0.2700	0.3704	0.4841	0.5701	0.6461	0.8609	0.9834	1.1373	1.2989	1.2918	1.2793	1.2739
Promedio	0.1454	0.2796	0.3642	0.4747	0.5601	0.6369	0.8574	0.9821	1.1470	1.2905	1.2866	1.2816	1.2749
Desviación estándar	0.0159	0.0085	0.0059	0.0107	0.0229	0.0103	0.0043	0.0093	0.0293	0.0128	0.0134	0.0148	0.0123
	0.1668	0.3086	0.3279	0.3771	0.4977	0.5321	0.6485	0.6952	0.9326	0.9914	1.0145	1.0113	1.0118
2000	0.1368	0.2966	0.3204	0.3717	0.4554	0.5367	0.6199	0.6985	0.9263	0.9841	1.0096	1.018	1.0103
	0.1478	0.3034	0.3249	0.3642	0.4396	0.5145	0.5920	0.6821	0.8950	0.9732	1.0067	1.0099	1.0121
Promedio	0.1504	0.3028	0.3244	0.3710	0.4642	0.5277	0.6202	0.6919	0.9179	0.9829	1.0103	1.0131	1.0114
Desviación estándar	0.0152	0.0060	0.0038	0.0064	0.0301	0.0117	0.0282	0.0087	0.0201	0.0092	0.0039	0.0043	0.0009
Absorbancia 680 nm													
	0.104	0.527	0.571	0.687	0.753	0.781	0.85	0.598	0.919	1.005	1.007	1.117	1.169
900	0.102	0.621	0.745	0.817	0.875	0.905	1.057	1.054	1.141	1.175	1.116	1.262	1.247
	0.130	0.377	0.441	0.497	0.557	0.571	0.759	0.85	0.883	0.975	0.921	1.037	1.137
Promedio	0.11	0.51	0.59	0.67	0.73	0.75	0.89	0.83	0.98	1.05	1.01	1.14	1.18
Desviación estándar	0.02	0.12	0.15	0.16	0.16	0.17	0.15	0.23	0.14	0.11	0.10	0.11	0.06
	0.122	0.627	0.737	0.839	0.911	0.751	0.747	0.728	1.007	1.023	1.062	1.077	1.011
1500	0.105	0.591	0.695	0.785	0.841	0.883	0.985	1.02	1.091	1.139	1.092	1.213	1.247
	0.104	0.669	0.817	0.862	0.963	0.981	1.136	1.111	1.203	1.203	1.189	1.251	1.281
Promedio	0.11	0.63	0.75	0.83	0.91	0.87	0.96	0.95	1.10	1.12	1.11	1.18	1.18
Desviación estándar	0.01	0.04	0.06	0.04	0.06	0.12	0.20	0.20	0.10	0.09	0.07	0.09	0.15
	0.129	0.463	0.557	0.521	0.703	0.757	1.003	0.874	1.101	1.129	1.117	1.191	1.231
2000	0.115	0.501	0.563	0.587	0.602	0.735	0.931	0.955	1.035	1.07	1.036	1.107	1.177
	0.107	0.479	0.467	0.519	0.571	0.61	0.803	0.82	0.887	0.893	0.901	1.013	1.199
Promedio	0.12	0.48	0.53	0.54	0.63	0.70	0.91	0.88	1.01	1.03	1.02	1.10	1.20
Desviación estándar	0.01	0.02	0.05	0.04	0.07	0.08	0.10	0.07	0.11	0.12	0.11	0.09	0.03
Lípidos (mg L⁻¹)													
	8.45	23.61	28.92	33.31	27.48	32.95	53.54	44.82	53.15	52.53	63.85	78.73	79.53
900	8.55	26.19	35.66	38.13	37.02	39.96	65.31	66.57	66.94	66.73	81.14	97.72	87.02
	7.36	19.85	21.33	22.61	21.44	27.02	40.97	53.20	42.04	42.45	50.27	81.67	82.473
Promedio	8.12	23.21	28.64	31.35	28.65	33.31	53.27	54.86	54.04	53.91	65.09	86.04	83.01

Desviación estándar	0.66	3.19	7.17	7.94	7.86	6.48	12.17	10.97	12.47	12.20	15.47	10.22	3.77
	7.76	27.77	37.91	45.72	37.49	37.83	42.84	46.42	59.12	57.68	52.12	82.21	70.702
1500	8.65	26.38	32.78	42.24	32.83	46.09	61.97	65.50	64.68	70.44	70.85	97.72	77.123
	8.75	24.60	36.95	38.77	48.54	56.56	74.41	73.89	75.99	74.55	81.34	105.75	101.73
Promedio	8.39	26.25	35.88	42.24	39.62	46.83	59.74	61.94	66.60	67.56	68.10	95.22	83.19
Desviación estándar	0.55	1.59	2.73	3.48	8.07	9.38	15.90	14.08	8.60	8.80	14.80	11.97	16.38
	5.78	24.70	21.00	23.47	31.44	32.95	61.17	59.08	60.97	59.33	73.32	89.21	94.778
2000	6.87	20.84	26.46	29.67	21.78	35.51	58.62	58.55	51.30	64.47	55.21	90.50	95.046
	4.98	17.67	23.68	22.07	23.76	29.69	52.34	44.64	47.60	41.42	41.63	87.03	81.938
Promedio	5.88	21.07	23.72	25.07	25.66	32.72	57.38	54.09	53.29	55.07	56.72	88.91	90.59
Desviación estándar	0.95	3.52	2.73	4.04	5.10	2.91	4.54	8.19	6.91	12.10	15.90	1.75	7.49
Lípidos (mg g⁻¹)													
	43.59	82.75	83.32	79.44	49.93	55.87	55.37	41.71	44.80	38.35	45.80	57.29	46.27
900	44.19	87.88	97.16	86.29	66.01	66.01	67.31	61.87	56.39	49.06	59.56	71.68	62.26
	39.83	69.16	62.52	55.11	40.86	47.60	42.33	49.45	35.55	31.22	37.12	60.24	55.98
Promedio	42.54	79.93	81.00	73.61	52.27	56.49	55.00	51.01	45.58	39.54	47.49	63.07	54.84
Desviación estándar	2.36	9.67	17.44	16.39	12.74	9.22	12.50	10.17	10.44	8.98	11.31	7.60	8.06
	41.70	97.05	105.73	95.85	70.21	59.24	49.89	46.86	50.10	44.48	40.20	63.36	46.39
1500	52.83	93.35	90.12	91.22	56.97	73.65	72.68	67.38	57.55	55.22	55.73	77.07	47.08
	44.54	91.11	99.76	80.08	85.13	87.54	86.43	75.13	66.82	57.40	62.97	82.66	64.32
Promedio	46.36	93.84	98.54	89.05	70.77	73.48	69.67	63.12	58.16	52.36	52.97	74.36	52.60
Desviación estándar	5.78	3.00	7.88	8.10	14.09	14.15	18.46	14.61	8.38	6.92	11.63	9.93	10.16
	34.63	80.05	64.05	62.23	63.16	61.93	94.31	84.99	65.38	59.84	72.27	88.21	73.85
2000	34.89	70.26	82.58	79.83	47.83	66.17	94.57	83.82	55.38	65.51	54.68	88.90	78.19
	26.54	58.23	72.87	60.60	54.06	57.71	88.40	65.44	53.18	42.56	41.35	86.18	75.94
Promedio	32.02	69.51	73.17	67.55	55.02	61.94	92.43	78.08	57.98	55.97	56.10	87.77	75.99
Desviación estándar	4.75	10.93	9.27	10.66	7.71	4.23	3.49	10.96	6.50	11.95	15.51	1.41	2.17

Estos resultados se graficaron para ver la curva de crecimiento de la microalga y el cambio en el contenido de lípidos de la misma.

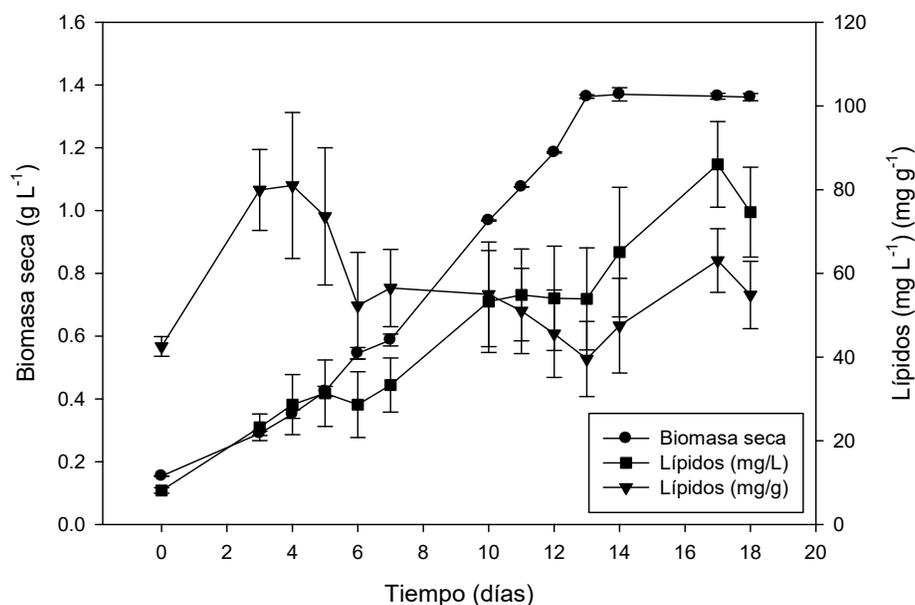


Figura 19. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

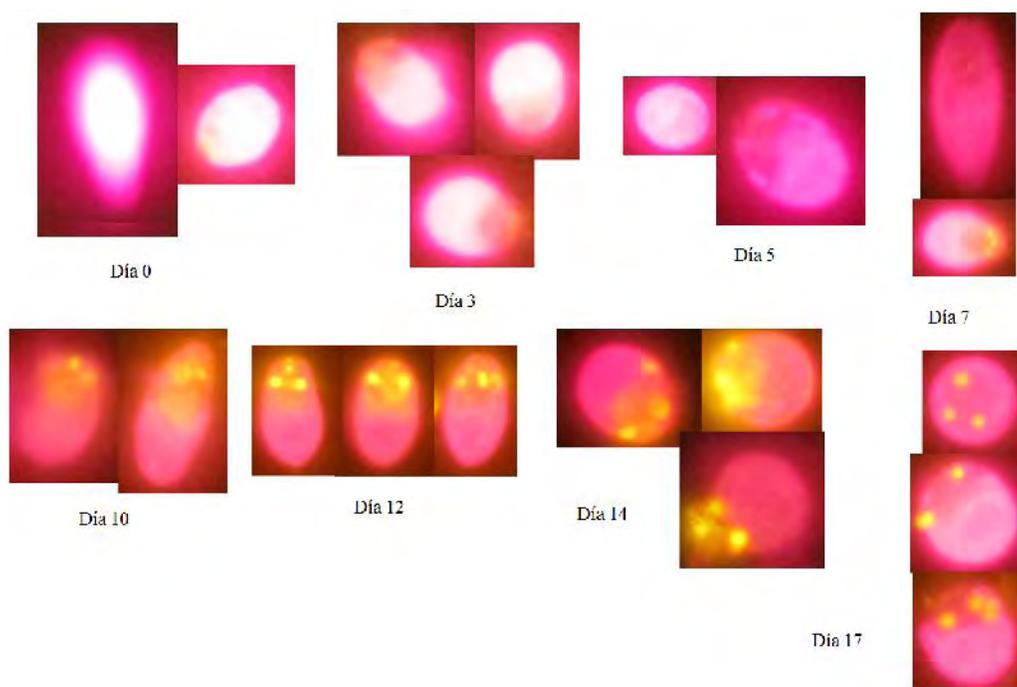


Figura 20. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de *Dunaliella* sp. a $900 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

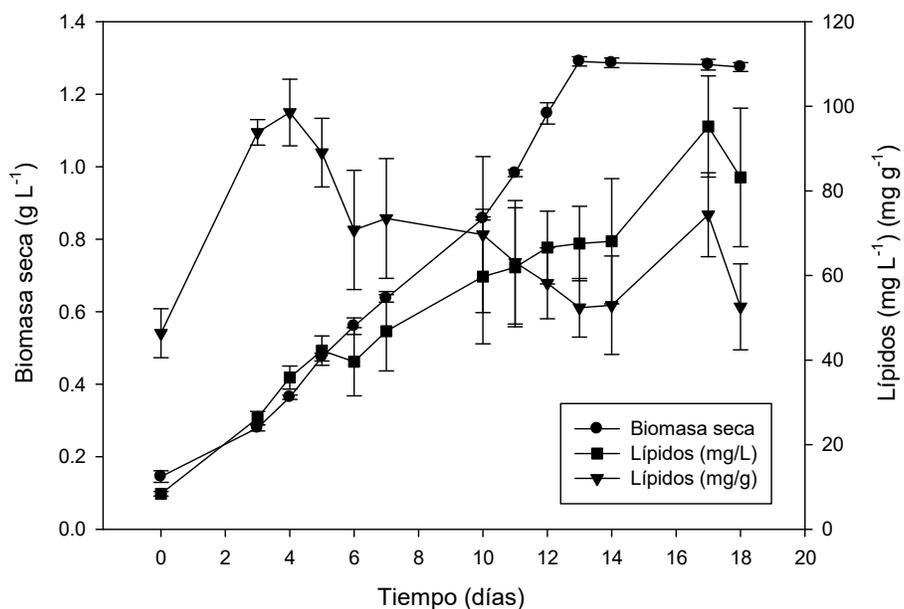


Figura 21. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

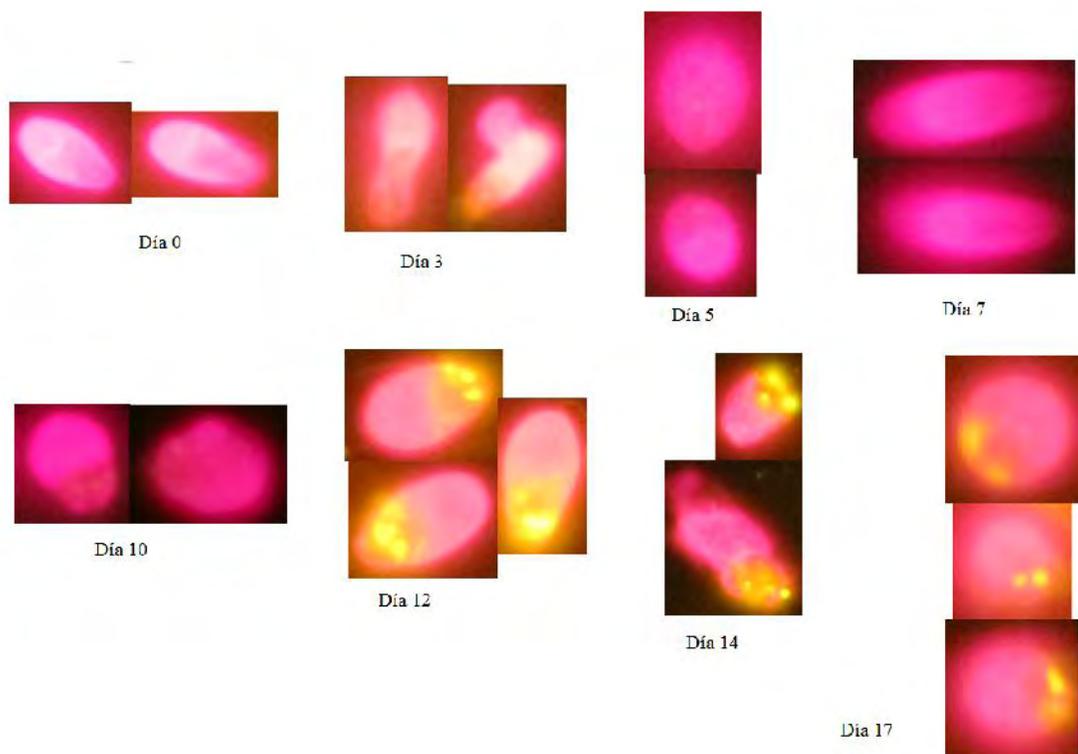


Figura 22. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de *Dunaliella* sp. a $1500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

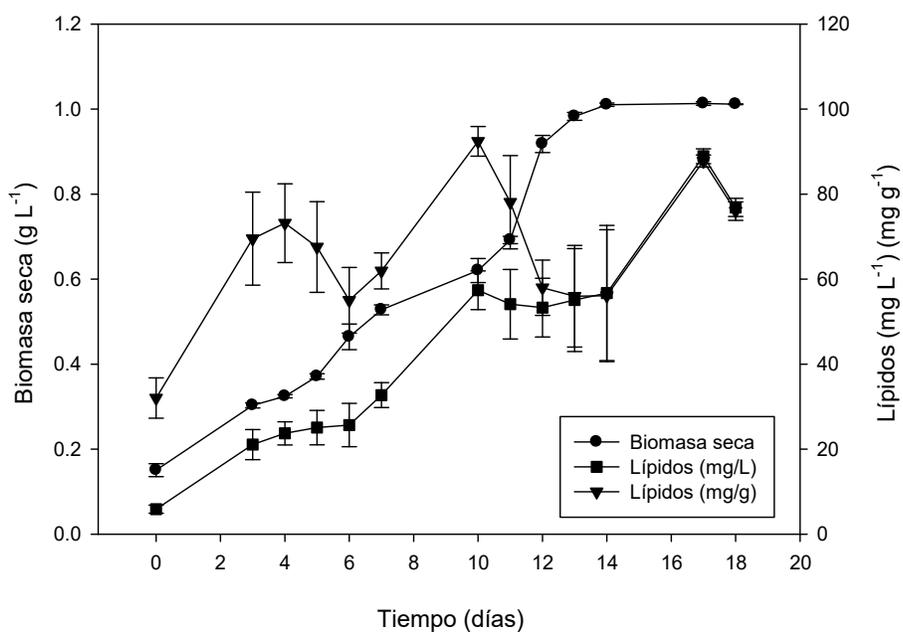


Figura 23. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

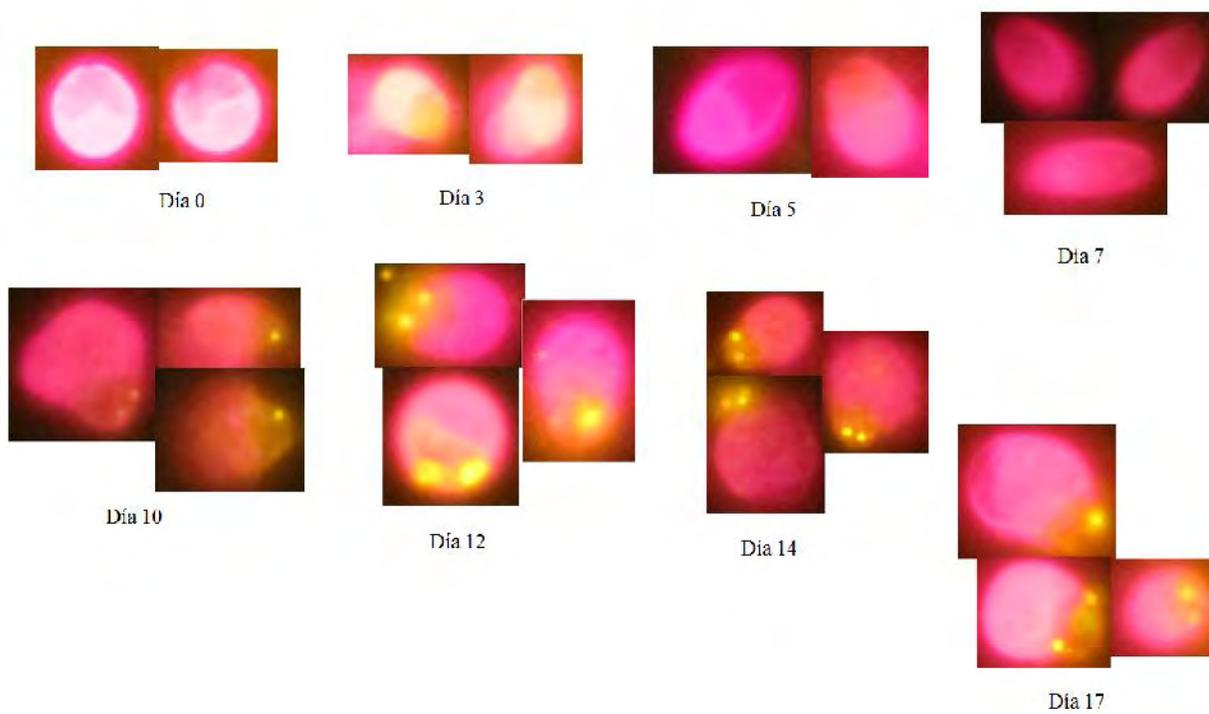


Figura 24. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de *Dunaliella* sp. a $2000 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

En el cultivo a las 3 diferentes DFFFA (900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hay un comportamiento similar, observándose que la fase estacionaria se alcanza alrededor del día 13 (Figura 19, Figura 21 y Figura 23), donde se observa un aumento en el contenido de lípidos del cultivo, llegando a su máximo al día 17, donde comienza a disminuir nuevamente, debido a que inicia la fase de muerte. En este caso el contenido de lípidos en el cultivo y en la biomasa tienen un comportamiento diferente, incluso se ve que el contenido de lípidos en la biomasa en la etapa estacionaria es menor al que se tiene en la fase logarítmica de cultivo. Esto se debe a que en el cultivo hay una alta concentración de biomasa con bajo contenido de lípidos.

Con la tinción con Rojo Nilo (Figura 20, Figura 22 y Figura 24) en las 3 DFFFA, se observa que en el día 10 empieza a ocurrir la acumulación de lípidos dentro de la microalga y en el día 12 ya hay una mayor cantidad de cuerpos lipídicos dentro de la misma, observándose una reducción al día 17.

Se realizó la comparación del contenido de biomasa y lípidos en los cultivos a las 3 diferentes DFFFA graficando estos parámetros.

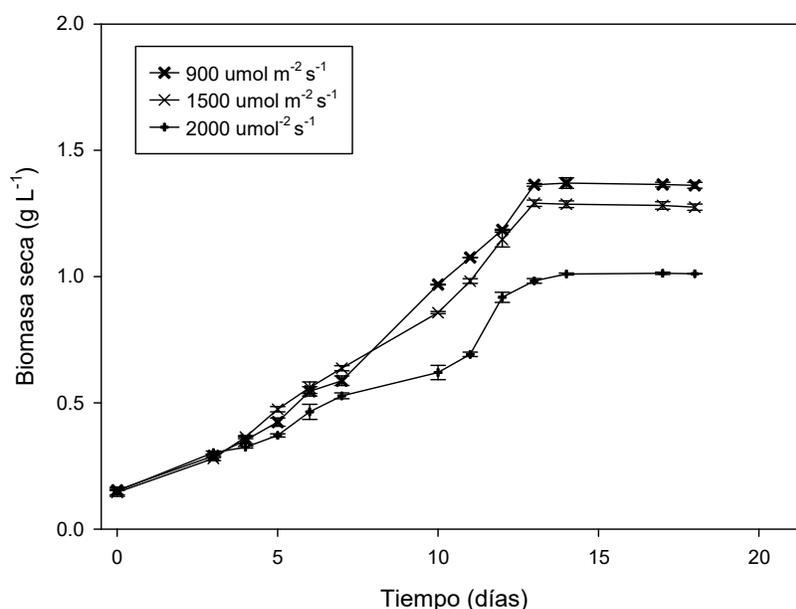


Figura 25. Contenido de biomasa en los cultivos de *Dunaliella* sp. a las diferentes DFFFA.

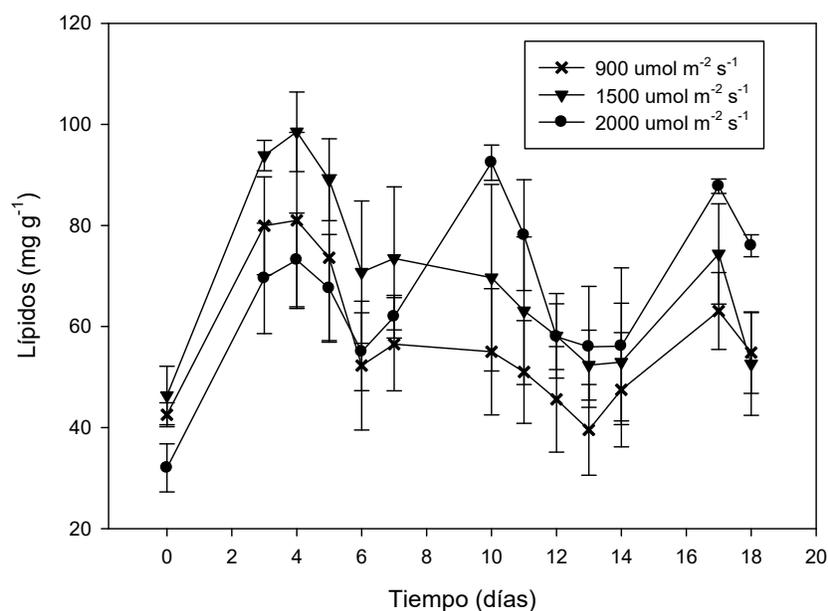


Figura 26. Contenido de lípidos en los cultivos de *Dunaliella* sp. a las diferentes DFFFA.

El mayor contenido de biomasa se obtuvo para los cultivos a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 25), sin embargo, el mayor contenido de lípidos se obtuvo en los cultivos a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 26).

A partir de los resultados de la Tabla 13 se calcularon la productividad de biomasa en el día 13 que es cuando acaba la fase logarítmica de crecimiento, la tasa de crecimiento específico y la productividad de lípidos (Tabla 14). Con estos resultados se puede ver que la microalga sometida a 900 y $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tienen productividades de biomasa similares, obteniéndose la mayor productividad de lípidos en los cultivos sometidos a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($p < 0.05$).

Tabla 14. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de *Dunaliella* sp- a diferentes DFFFA.

DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Productividad de biomasa	Tasa de crecimiento específico	Productividad de lípidos
900	$68.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.191 día^{-1}	$16.43 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$
1500	$69.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.201 día^{-1}	$19.42 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$
2000	$52.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.172 día^{-1}	$14.84 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$

Al realizar el análisis estadístico, sucede algo similar que con *Tetraselmis* sp., con la concentración de nitrógeno total como factor se obtiene que esta si es significativa ($p < 0.05$) para la productividad de lípidos. Nuevamente al tener la DFFFA como factor se obtiene que esta no es significativa para la productividad de lípidos. Si se hace un diseño con 3 factores que son la DFFFA, la concentración de nitrógeno total y el tiempo, se obtiene que hay una interacción entre el tiempo y la concentración de nitrógeno ($p < 0.05$), esto es de esperarse ya que en el transcurso del cultivo hay una reducción de la concentración de nitrógeno. Además se obtiene que tanto el tiempo como la concentración de nitrógeno total tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la productividad de lípidos.

Se realizó la caracterización del agua residual durante todo el cultivo para determinar el contenido de nutrientes en la misma y ver cómo afecta esto al contenido de lípidos y biomasa en el cultivo, primero se muestra el contenido de nitratos, nitritos y nitrógeno amoniacal, además del nitrógeno total que es la suma de las 3 formas de nitrógeno y también se muestra el contenido de ortofosfatos y DQO (Tabla 15). Estos datos se graficaron para determinar cómo afectó la concentración de nutrientes al contenido de biomasa y lípidos en los cultivos.

Tabla 15. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de *Dunaliella* sp a diferentes DFFFA.

Día	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Nitritos (mg L^{-1})												
	6.57	6.41	6.40	5.95	6.42	5.74	6.93	6.80	6.35	6.32	6.49	1.45	0.32
900	6.47	6.25	6.21	6.19	5.90	5.77	6.13	6.72	1.24	1.00	0.98	0.43	0.35
	7.31	5.34	5.47	5.41	5.67	5.25	5.58	4.35	4.64	4.72	4.94	1.24	0.10
Promedio	6.78	6.00	6.03	5.85	6.00	5.59	6.21	5.96	4.08	4.01	4.14	1.04	0.26
Desviación estándar	0.46	0.57	0.49	0.40	0.38	0.29	0.68	1.39	2.60	2.73	2.84	0.53	0.14
	7.02	6.12	5.74	6.29	5.92	6.08	6.51	5.13	3.52	2.21	1.76	0.85	0.69
1500	6.57	6.50	6.29	6.30	6.35	5.93	6.00	5.59	3.12	0.91	1.61	0.14	0.10
	6.50	6.31	6.35	6.09	6.09	4.95	4.73	1.17	0.90	0.71	0.53	0.51	0.14
Promedio	6.70	6.31	6.13	6.23	6.12	5.65	5.75	3.97	2.51	1.28	1.30	0.50	0.31
Desviación estándar	0.28	0.19	0.34	0.12	0.22	0.62	0.91	2.43	1.41	0.82	0.67	0.36	0.33
	6.41	6.18	6.25	6.64	5.95	5.54	5.69	4.07	0.34	0.18	<0.10	<0.10	<0.10
2000	7.05	6.99	6.43	6.67	6.64	6.85	6.84	6.67	5.72	5.54	4.18	<0.10	<0.10
	7.15	6.83	6.80	6.71	6.92	6.97	6.90	6.95	5.22	5.35	4.65	1.19	<0.10
Promedio	6.87	6.66	6.50	6.67	6.50	6.45	6.48	5.90	3.76	3.69	2.98	0.46	0.10
Desviación estándar	0.40	0.43	0.28	0.03	0.50	0.79	0.68	1.59	2.97	3.04	2.50	0.63	0.00
	Nitratos (mg L^{-1})												
	33.94	33.72	33.11	32.58	31.14	31.13	29.61	27.12	17.72	13.78	8.80	4.11	1.75
900	33.98	33.27	32.14	31.11	30.71	17.21	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	30.84	30.37	30.34	30.80	24.46	23.69	16.56	15.03	14.83	13.07	12.74	7.02	<1.00
Promedio	32.92	32.45	31.86	31.49	28.77	24.01	15.72	14.39	11.18	9.28	7.51	4.04	1.25
Desviación estándar	1.80	1.82	1.40	0.95	3.74	6.97	14.32	13.07	8.94	7.18	5.98	3.01	0.43
	33.86	33.65	32.35	31.45	18.43	10.68	6.78	4.99	3.91	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
1500	36.86	32.92	31.29	31.62	30.60	25.48	3.93	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	35.05	31.20	31.98	30.19	15.69	7.72	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
Promedio	35.26	32.59	31.87	31.08	21.57	14.63	3.90	2.33	1.97	1.00	1.00	1.00	1.00

Desviación estándar	1.51	1.26	0.54	0.78	7.94	9.52	2.89	2.30	1.68	0.00	0.00	0.00	0.00
2000	36.17	35.41	34.18	34.77	24.19	24.34	3.69	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	36.32	35.15	34.22	33.29	29.12	28.39	19.39	9.32	3.05	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
Promedio	34.52	34.40	33.73	34.33	33.79	25.30	23.21	11.55	9.99	6.79	5.37	3.73	<1.00
Desviación estándar	35.67	34.98	34.05	34.13	29.03	26.01	15.43	7.29	4.68	2.93	2.46	1.91	1.00
	1.00	0.52	0.27	0.76	4.80	2.11	10.34	5.56	4.71	3.34	2.52	1.58	0.00
Nitrógeno amoniacal (mg L⁻¹)													
900	25.22	3.08	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	25.41	2.47	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	25.25	5.90	5.63	4.10	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Desviación estándar	25.30	3.82	2.21	1.70	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	0.10	1.83	2.96	2.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1500	22.64	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	27.64	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	21.89	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Desviación estándar	24.06	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	3.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2000	20.54	6.70	3.97	2.47	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	23.19	5.22	4.37	2.82	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Promedio	22.89	1.79	5.94	3.24	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
Desviación estándar	22.21	4.57	4.76	2.84	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	1.45	2.52	1.04	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrógeno total (mg L⁻¹)													
900	65.73	43.21	40.01	39.02	38.06	37.37	37.05	34.43	24.58	20.60	15.79	6.05	2.57
	65.86	41.99	38.85	37.80	37.11	23.48	7.63	8.22	2.74	2.50	2.48	1.93	1.85
Promedio	63.40	41.61	41.44	40.31	30.64	29.44	22.63	19.88	19.97	18.29	18.19	8.76	1.60
Desviación estándar	65.00	42.27	40.10	39.05	35.27	30.10	22.43	20.84	15.76	13.80	12.15	5.58	2.01
1500	1.38	0.84	1.30	1.26	4.04	6.97	14.71	13.13	11.51	9.85	8.46	3.44	0.50
	63.51	40.26	38.59	38.23	24.84	17.26	13.79	10.62	7.93	3.71	3.26	2.35	2.19

	71.08	39.93	38.08	38.43	37.45	31.91	10.43	7.09	4.62	2.41	3.11	1.64	1.60
	63.45	38.01	38.84	36.78	22.28	13.16	6.23	2.67	2.40	2.21	2.03	2.01	1.64
Promedio	66.01	39.40	38.50	37.81	28.19	20.78	10.15	6.79	4.98	2.78	2.80	2.00	1.81
Desviación estándar	4.39	1.22	0.39	0.90	8.12	9.86	3.79	3.98	2.79	0.82	0.67	0.36	0.33
	63.11	48.29	44.41	43.88	30.64	30.39	9.88	5.57	1.84	1.68	1.60	1.60	1.60
2000	66.56	47.35	45.03	42.79	36.26	35.74	26.72	16.50	9.27	7.04	5.68	1.60	1.60
	64.57	43.01	46.47	44.27	41.20	32.77	30.61	19.00	15.71	12.64	10.52	5.42	1.60
Promedio	64.75	46.22	45.30	43.65	36.03	32.96	22.40	13.69	8.94	7.12	5.94	2.87	1.60
Desviación estándar	1.73	2.81	1.06	0.77	5.29	2.68	11.02	7.14	6.94	5.48	4.47	2.21	0.00
Ortofosfatos (mg L⁻¹)													
	16.27	16.21	13.91	13.50	10.15	8.96	5.91	3.70	3.21	2.35	2.24	1.53	1.03
900	17.21	16.48	14.71	11.91	10.93	7.55	5.21	3.79	2.96	2.45	1.71	1.13	0.97
	16.56	14.95	15.28	13.43	10.04	7.90	7.26	4.80	2.97	2.39	2.05	1.07	0.99
Promedio	16.68	15.88	14.63	12.95	10.37	8.13	6.13	4.10	3.04	2.40	2.00	1.24	1.00
Desviación estándar	0.48	0.82	0.69	0.90	0.49	0.74	1.04	0.61	0.14	0.05	0.27	0.25	0.03
	17.80	15.43	13.30	11.94	10.37	8.47	7.39	4.66	3.20	2.67	1.97	1.45	1.09
1500	17.02	15.59	13.70	12.96	10.07	8.06	5.92	3.96	3.14	3.06	2.15	1.37	1.01
	18.90	15.40	13.32	12.96	10.97	8.14	5.77	3.95	3.26	2.83	1.77	1.34	0.99
Promedio	17.90	15.47	13.44	12.62	10.47	8.23	6.36	4.19	3.20	2.85	1.97	1.39	1.03
Desviación estándar	0.94	0.10	0.23	0.59	0.46	0.22	0.90	0.41	0.06	0.20	0.19	0.06	0.05
	18.32	15.51	13.62	13.57	10.90	9.14	7.05	4.66	3.16	2.38	2.03	1.73	1.13
2000	17.09	15.42	13.65	12.51	11.00	8.91	6.33	3.68	2.99	2.17	2.05	1.69	1.25
	16.15	14.86	14.36	12.54	10.27	9.50	7.98	4.69	2.98	2.87	1.96	1.35	1.09
Promedio	17.19	15.26	13.87	12.88	10.72	9.18	7.12	4.34	3.04	2.47	2.01	1.59	1.16
Desviación estándar	1.09	0.35	0.42	0.61	0.40	0.29	0.83	0.58	0.10	0.36	0.05	0.21	0.08
Demanda Química de Oxígeno (mg O₂ L⁻¹)													
	280.5	244.59	212.62	184.08	156.22	116.58	81.58	70.73	56.24	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
900	275.5	242.57	208.71	183.94	155.28	115.45	79.13	68.14	55.18	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
	270.5	244.91	207.07	183.94	157.85	119.15	78.73	66.22	50.34	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00

Promedio	275.50	244.02	209.47	183.99	156.45	117.06	79.81	68.36	53.92	50.00	50.00	50.00	50.00
Desviación estándar	5.00	1.27	2.85	0.08	1.30	1.90	1.54	2.27	3.15	0.00	0.00	0.00	0.00
	295.5	243.04	208.39	179.39	150.71	109.73	74.31	55.46	50.38	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
1500	270.5	246.50	206.62	177.87	150.88	114.97	74.07	56.59	50.72	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
	285.5	246.73	210.89	180.69	150.17	115.03	75.79	53.06	52.67	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
Promedio	283.83	245.42	208.63	179.31	150.59	113.24	74.73	55.03	51.26	50.00	50.00	50.00	50.00
Desviación estándar	12.58	2.07	2.15	1.41	0.37	3.05	0.93	1.80	1.24	0.00	0.00	0.00	0.00
	270.5	241.12	216.51	185.26	153.47	126.41	96.01	61.75	57.97	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
2000	255.5	244.26	213.33	189.99	155.35	127.97	96.50	66.67	58.59	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
	275.5	242.44	214.03	188.43	153.61	120.72	93.36	63.63	58.32	<50.00	<50.00	<50.00	<50.00
Promedio	267.17	242.61	214.62	187.89	154.14	125.03	95.29	64.02	58.30	50.00	50.00	50.00	50.00
Desviación estándar	10.41	1.57	1.67	2.41	1.05	3.81	1.69	2.48	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00

En los cultivos para las 3 diferentes DFFFA, la remoción del nitrógeno total fue mayor al 95 %. Para los ortofosfatos la remoción fue mayor al 90 % en las 3 DFFFA. Hubo una remoción de DQO cercana al 80 % para todos los cultivos. Las cinéticas de remoción fueron de alrededor de 3.5 mg L⁻¹ día para el nitrógeno total, de alrededor de 17 mg O₂ L⁻¹ día para la DQO y cercana a 0.9 mg L⁻¹ día de ortofosfatos para los cultivos a todas las DFFFA.

Los datos contenidos en la Tabla 15 se graficaron para ver la disminución en la concentración de nutrientes del medio de cultivo, el nitrógeno se graficó como nitrógeno total.

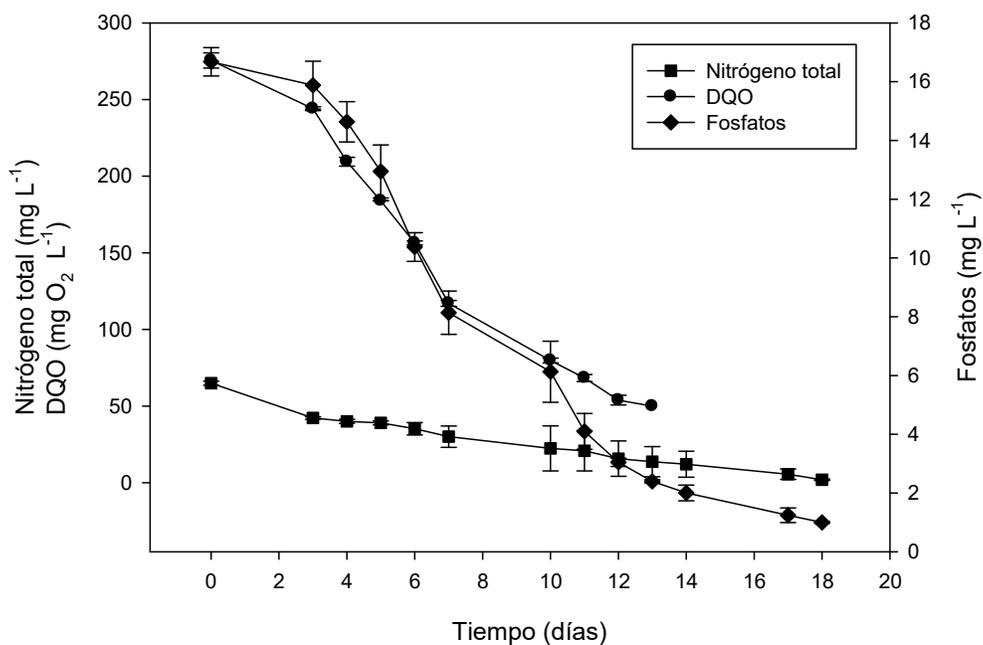


Figura 27. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En la Figura 27 se puede ver que a partir del día 11, el nitrógeno total alcanza concentraciones bajas y a partir del día 12 las concentraciones de ortofosfatos y DQO también son bajas, a partir de estos días es que la microalga alcanza su fase estacionaria de crecimiento y coincide con el inicio del aumento de la cantidad de lípidos en el cultivo unos días después (Figura 26).

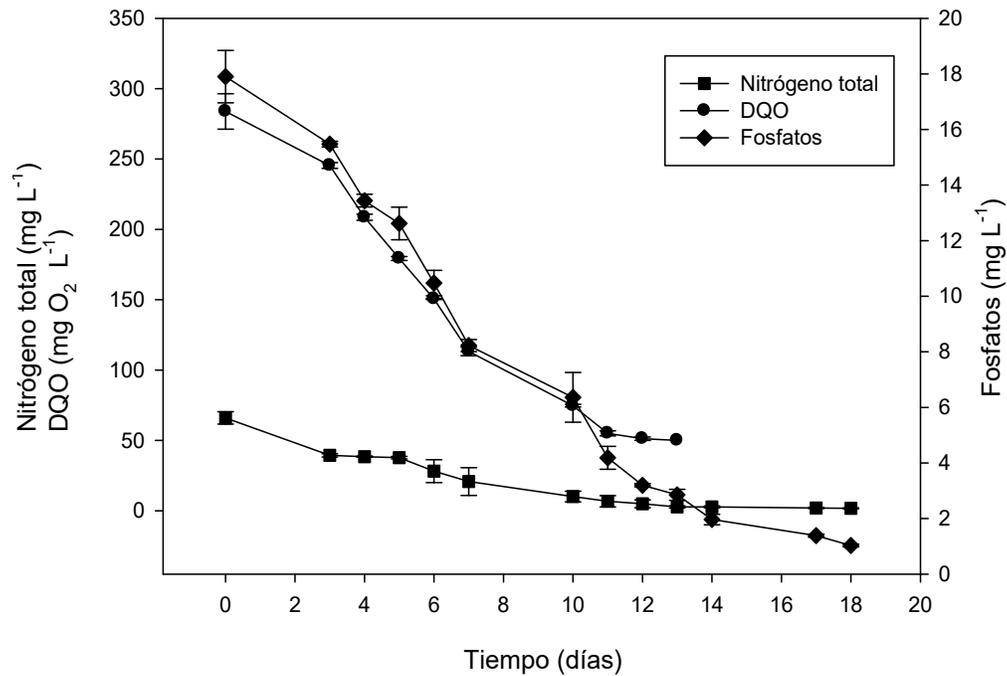


Figura 28. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el caso del cultivo a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el nitrógeno total alcanza concentraciones bajas a partir del día 10 y los ortofosfatos y la DQO llegan a bajas concentraciones en el día 12 (Figura 28). Al mismo tiempo que se tienen bajas concentraciones de nutrientes en los cultivos es cuando comienza la fase estacionaria y también el aumento en la concentración de lípidos en las microalgas (Figura 26).

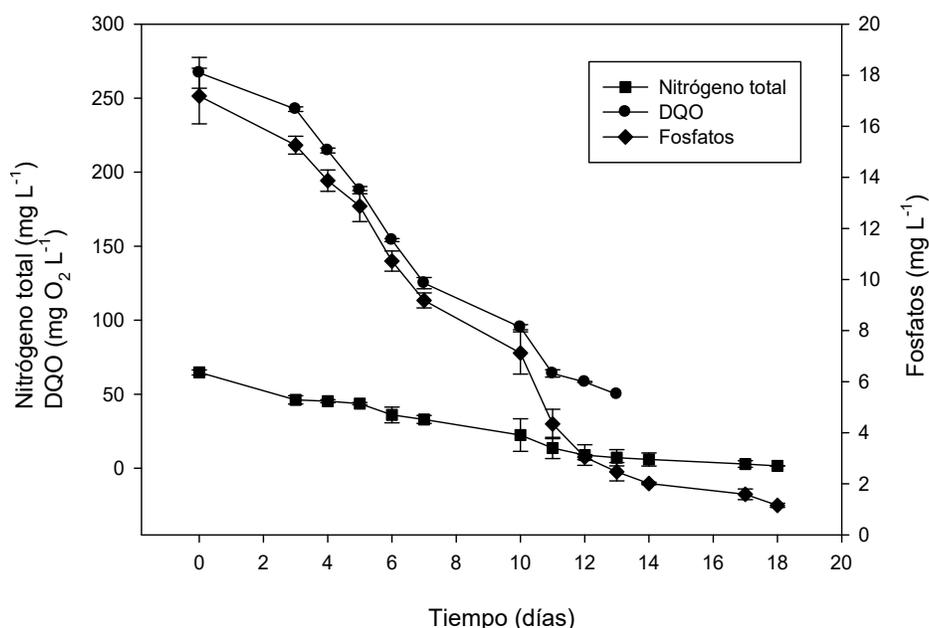


Figura 29. Contenido de nutrientes en el agua residual en los cultivos de *Dunaliella* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

De la forma similar a lo que sucedió con los cultivos a las otras dos DFFFA, en el día 11 el nitrógeno total llega a concentraciones bajas y alrededor del día 12 las concentraciones de ortofosfatos y DQO son bajas (Figura 29), lo que corresponde con el aumento de la cantidad de lípidos en la fase estacionaria del cultivo (Figura 26).

Se determinó el contenido de clorofila en los cultivos, los datos se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Contenido de clorofila en los cultivos de *Dunaliella* sp.

Día	0	4	6	11
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Clorofila $\mu\text{g L}^{-1}$			
	2136.0	213.6	4699.3	5286.6
900	160.2	373.8	3577.7	3204.0
	53.4	1869.0	4325.0	3208.0
Promedio	783.2	818.8	4200.7	3899.5
Desviación estándar	1172.8	913.0	571.0	1201.2
	801.0	854.4	6621.6	4859.4
1500	213.6	694.2	6087.6	3310.7
	427.2	1228.2	8063.9	3951.6
Promedio	480.6	925.6	6924.4	4040.6

Desviación estándar	297.3	274.0	1022.3	778.2
	1388.4	801.0	4539.0	3364.2
2000	106.8	3577.8	6078.8	2242.8
	534.0	2346.3	4859.4	2776.8
Promedio	676.4	2241.7	5159.1	2794.6
Desviación estándar	652.6	1391.4	812.5	560.9
Clorofila ($\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa)				
	13879.1	615.4	8536.4	4920.1
900	1043.6	1018.3	6379.6	2977.7
	345.0	5479.3	8244.4	2981.7
Promedio	5089.3	2371.0	7720.1	3626.5
Desviación estándar	7620.3	2699.4	1170.1	1120.3
	5889.7	2382.6	12402.3	4905.5
1500	1304.8	1908.7	10563.2	3405.4
	3132.0	3315.9	14144.7	4018.3
Promedio	3442.2	2535.7	12370.1	4109.7
Desviación estándar	2308.1	716.0	1790.9	754.2
	8323.7	2442.8	9120.0	4839.2
2000	780.7	11166.7	13348.3	3210.9
	3613.0	7221.6	11054.1	4071.0
Promedio	4239.1	6943.7	11174.1	4040.3
Desviación estándar	3810.3	4368.6	2116.7	814.6

Con los datos de la Tabla 16 se puede ver que al principio hay un aumento en el contenido de clorofila, lo cual puede deberse a que la microalga aunque pudo tener un metabolismo mixótrofo debido a la presencia de carbono orgánico, tuvo una preferencia por el carbono inorgánico. Posteriormente hay una disminución en el contenido de clorofila que puede deberse a la falta de nitrógeno, nutriente esencial para la síntesis de clorofila.

Cultivo de *Nannochloropsis* sp.

El cultivo de esta microalga tuvo una duración de 21 días, ya que en este tiempo se alcanzó la fase de muerte donde la biomasa seca comenzó a reducirse.

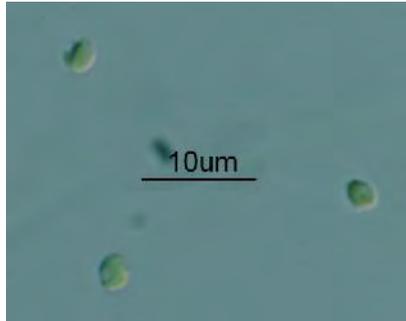


Figura 30. Fotografía de *Nannochloropsis* sp.

El pH, el oxígeno disuelto y la temperatura de los cultivos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. pH, oxígeno disuelto y temperatura en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	19	20	21
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	pH															
900	7.39	7.67	8.10	8.22	8.29	8.00	8.22	8.22	8.87	8.21	8.57	8.60	8.38	8.22	8.47	8.29
	7.34	7.72	8.00	8.15	8.36	8.02	8.19	8.19	8.11	8.17	8.21	8.04	8.13	8.14	8.22	8.17
	7.44	7.70	8.39	8.45	8.54	8.48	8.50	8.50	8.45	8.30	8.42	8.21	8.12	8.76	8.29	8.26
Promedio	7.39	7.70	8.16	8.27	8.40	8.17	8.30	8.30	8.48	8.23	8.40	8.28	8.21	8.37	8.33	8.24
Desviación estándar	0.05	0.03	0.20	0.16	0.13	0.27	0.17	0.17	0.38	0.07	0.18	0.29	0.15	0.34	0.13	0.06
1500	7.39	7.67	8.10	8.22	8.29	8.00	8.22	8.22	8.87	8.21	8.57	8.60	8.38	8.22	8.47	8.29
	7.34	7.72	8.00	8.15	8.36	8.02	8.19	8.19	8.11	8.17	8.21	8.04	8.13	8.14	8.22	8.17
	7.44	7.70	8.39	8.45	8.54	8.48	8.50	8.50	8.45	8.30	8.42	8.21	8.12	8.76	8.29	8.26
Promedio	7.39	7.70	8.16	8.27	8.40	8.17	8.30	8.30	8.48	8.23	8.40	8.28	8.21	8.37	8.33	8.24
Desviación estándar	0.05	0.03	0.20	0.16	0.13	0.27	0.17	0.17	0.38	0.07	0.18	0.29	0.15	0.34	0.13	0.06
2000	7.39	7.67	8.10	8.22	8.29	8.00	8.22	8.22	8.87	8.21	8.57	8.60	8.38	8.22	8.47	8.29
	7.34	7.72	8.00	8.15	8.36	8.02	8.19	8.19	8.11	8.17	8.21	8.04	8.13	8.14	8.22	8.17
	7.44	7.70	8.39	8.45	8.54	8.48	8.50	8.50	8.45	8.30	8.42	8.21	8.12	8.76	8.29	8.26
Promedio	7.39	7.70	8.16	8.27	8.40	8.17	8.30	8.30	8.48	8.23	8.40	8.28	8.21	8.37	8.33	8.24
Desviación estándar	0.05	0.03	0.20	0.16	0.13	0.27	0.17	0.17	0.38	0.07	0.18	0.29	0.15	0.34	0.13	0.06
Oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)																
900	5.95	6.18	4.61	6.02	5.49	6.26	5.25	4.29	4.84	5.11	4.75	5.20	5.21	4.37	6.17	4.28
	5.36	6.27	4.58	6.01	5.98	5.73	4.31	6.23	5.80	5.16	4.30	5.78	4.78	5.21	5.67	6.22
	5.54	6.19	4.95	6.32	5.53	4.53	5.91	4.30	4.85	4.42	5.66	4.37	4.83	5.04	4.40	4.19
Promedio	5.62	6.21	4.71	6.12	5.67	5.51	5.16	4.94	5.16	4.90	4.90	5.12	4.94	4.87	5.41	4.90
Desviación estándar	0.30	0.05	0.21	0.18	0.27	0.89	0.80	1.12	0.55	0.41	0.69	0.71	0.24	0.44	0.91	1.15
1500	5.35	5.58	4.84	5.70	4.76	4.45	4.78	5.82	5.40	4.38	4.65	4.16	4.13	6.31	4.19	4.56
	5.86	5.99	4.25	4.89	4.41	6.31	4.55	4.60	5.14	6.26	5.67	5.57	4.99	5.59	5.41	5.26

	5.02	5.18	4.96	4.70	5.61	5.84	4.56	4.62	4.86	4.33	4.41	5.19	4.37	4.65	6.25	4.48
Promedio	5.41	5.58	4.68	5.10	4.93	5.53	4.63	5.01	5.13	4.99	4.91	4.97	4.50	5.52	5.28	4.77
Desviación estándar	0.42	0.41	0.38	0.53	0.62	0.97	0.13	0.70	0.27	1.10	0.67	0.73	0.44	0.83	1.04	0.43
	5.78	4.95	4.62	5.63	6.26	5.93	4.64	5.83	4.90	5.55	5.81	6.17	5.15	5.69	4.65	6.20
2000	5.99	5.46	5.98	4.38	5.43	5.50	5.34	4.22	6.25	4.37	5.24	5.27	5.63	5.14	5.98	4.44
	4.91	5.87	6.25	6.32	6.17	5.15	6.16	5.22	5.78	6.16	4.40	4.60	5.77	4.55	4.50	5.90
Promedio	5.56	5.43	5.62	5.44	5.95	5.53	5.38	5.09	5.64	5.36	5.15	5.35	5.52	5.13	5.04	5.51
Desviación estándar	0.57	0.46	0.87	0.98	0.46	0.39	0.76	0.81	0.69	0.91	0.71	0.79	0.33	0.57	0.81	0.94
	Temperatura (°C)															
Promedio	27.5	27	26	24.5	23	24.5	25	23.5	27	26	24	24.5	23	23.5	24.5	25.5
Desviación estándar	6.4	7.1	7.1	3.5	5.7	7.8	9.9	7.8	8.5	8.5	5.7	7.8	7.1	6.4	7.8	7.8

En la Tabla 18 se muestra el crecimiento de la microalga tanto en biomasa seca como la absorbancia del cultivo a 680 nm, además del contenido de lípidos en el cultivo en las 3 diferentes DFFFA. A partir del contenido de biomasa en el cultivo y de la cantidad de lípidos en el mismo, se calculó el contenido de lípidos en la biomasa como mg de lípidos g⁻¹ de biomasa.

Tabla 18. Contenido de biomasa y lípidos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a diferentes DFFFA.

Día	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	19	20	21
Irradiación ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Biomasa (g L⁻¹)															
	0.3923	0.4231	0.5962	0.8843	0.9986	1.1143	1.3467	1.5267	1.6533	1.7000	1.7800	1.8300	1.6200	1.6100	1.5800	1.6400
900	0.3846	0.4000	0.6000	0.8714	0.9843	1.1286	1.3667	1.4933	1.7067	1.7200	1.7300	1.7800	1.5600	1.5600	1.4900	1.4400
	0.3231	0.4769	0.5831	0.8971	1.0043	1.1300	1.3667	1.5067	1.7033	1.7400	1.7900	1.8200	1.5300	1.4400	1.4400	1.4800
Promedio	0.3667	0.4333	0.5931	0.8843	0.9957	1.1243	1.3600	1.5089	1.6878	1.7200	1.7667	1.8100	1.5700	1.5367	1.5033	1.5200
Desviación estándar	0.0379	0.0395	0.0089	0.0129	0.0103	0.0087	0.0115	0.0168	0.0299	0.0200	0.0321	0.0265	0.0458	0.0874	0.0709	0.1058
1500	0.3077	0.4154	0.5077	0.8143	0.9571	1.0143	1.3200	1.4333	1.6333	1.6500	1.6730	1.6800	1.4300	1.5300	1.4000	1.4400

	0.2915	0.3777	0.5385	0.8157	0.9286	1.1571	1.2800	1.3733	1.5867	1.6300	1.6600	1.6870	1.4700	1.5300	1.3600	1.4100
	0.2923	0.3593	0.5308	0.8000	0.9286	1.1286	1.2400	1.3400	1.5733	1.6400	1.6575	1.7088	1.4900	1.4800	1.3500	1.4330
Promedio	0.2972	0.3841	0.5256	0.8100	0.9381	1.1000	1.2800	1.3822	1.5978	1.6400	1.6635	1.6919	1.4633	1.5133	1.3700	1.4277
Desviación estándar	0.0091	0.0286	0.0160	0.0087	0.0165	0.0756	0.0400	0.0473	0.0315	0.0100	0.0083	0.0150	0.0306	0.0289	0.0265	0.0157
	0.4385	0.4846	0.6615	0.8143	0.9714	1.0000	1.1533	1.2667	1.4400	1.4600	1.4900	1.5100	1.3400	1.3400	1.3900	1.3400
2000	0.3615	0.4231	0.6385	0.8786	0.9857	1.0143	1.2600	1.2467	1.4833	1.4900	1.5050	1.5300	1.3800	1.5600	1.3200	1.3200
	0.3615	0.4356	0.6846	0.9286	0.9571	1.0286	1.2667	1.2600	1.5233	1.5300	1.5530	1.5750	1.3700	1.3000	1.3700	1.3600
Promedio	0.3872	0.4478	0.6615	0.8738	0.9714	1.0143	1.2267	1.2578	1.4822	1.4933	1.5160	1.5383	1.3633	1.4000	1.3600	1.3400
Desviación estándar	0.0444	0.0325	0.0231	0.0573	0.0143	0.0143	0.0636	0.0102	0.0417	0.0351	0.0329	0.0333	0.0208	0.1400	0.0361	0.0200
Absorbancia 680 nm																
	0.104	0.526	0.790	1.013	0.930	1.215	1.251	1.269	1.543	1.521	1.563	1.661	1.624	1.784	1.752	1.880
900	0.102	0.513	0.771	1.011	1.014	1.205	1.261	1.242	1.323	1.467	1.366	1.457	1.490	1.597	1.500	1.607
	0.130	0.514	0.759	1.003	0.870	1.153	1.227	1.188	1.127	1.263	1.258	1.342	1.361	1.454	1.341	1.457
Promedio	0.112	0.518	0.773	1.009	0.938	1.191	1.246	1.233	1.331	1.417	1.396	1.487	1.492	1.612	1.531	1.648
Desviación estándar	0.015	0.007	0.016	0.005	0.072	0.033	0.017	0.041	0.208	0.136	0.155	0.162	0.132	0.165	0.207	0.214
	0.122	0.494	0.779	0.987	0.960	1.090	1.191	1.176	1.177	1.321	1.318	1.340	1.381	1.305	1.367	1.496
1500	0.105	0.514	0.831	1.501	1.650	1.851	1.973	2.059	2.270	2.310	2.298	2.368	2.382	2.485	2.461	2.341
	0.104	0.489	0.781	1.057	1.035	1.239	1.323	1.272	1.372	1.438	1.385	1.485	1.450	1.542	1.375	1.578
Promedio	0.110	0.499	0.797	1.182	1.215	1.393	1.496	1.502	1.606	1.690	1.667	1.731	1.738	1.777	1.734	1.805
Desviación estándar	0.010	0.013	0.029	0.279	0.379	0.403	0.419	0.484	0.583	0.540	0.547	0.556	0.559	0.624	0.629	0.466
	0.129	0.473	0.730	1.177	1.320	1.485	1.527	1.596	1.603	1.738	1.716	1.834	1.813	1.765	1.695	1.887
2000	0.115	0.494	0.796	1.351	1.415	1.590	1.739	1.854	2.149	2.232	2.225	2.296	2.320	2.354	2.431	2.528
	0.107	0.489	0.763	1.033	1.086	1.161	1.319	1.248	1.378	1.545	1.670	1.650	1.648	1.729	1.755	1.909
Promedio	0.117	0.485	0.763	1.187	1.274	1.412	1.528	1.566	1.710	1.838	1.870	1.927	1.927	1.949	1.960	2.108

Desviación estándar	0.011	0.011	0.033	0.159	0.169	0.224	0.210	0.304	0.396	0.354	0.308	0.333	0.350	0.351	0.409	0.364
	Lípidos(mg L⁻¹)															
900	4.11	9.81	13.40	15.90	21.92	22.80	27.71	24.69	32.49	26.37	40.55	38.62	40.66	51.54	53.15	54.35
	4.76	8.54	15.18	22.15	29.50	21.37	31.02	31.88	27.64	28.64	35.68	31.94	32.28	36.57	44.66	38.95
Promedio	4.17	9.55	16.50	21.25	22.99	19.71	26.49	27.86	24.01	25.73	27.98	27.07	30.92	37.36	42.85	38.95
Desviación estándar	4.35	9.30	15.03	19.77	24.80	21.29	28.40	28.15	28.05	26.91	34.73	32.54	34.62	41.82	46.89	44.08
	0.36	0.67	1.55	3.38	4.11	1.55	2.34	3.61	4.25	1.53	6.34	5.80	5.28	8.43	5.50	8.89
1500	3.53	9.35	14.20	20.21	24.92	19.41	25.70	34.32	30.35	23.95	27.98	27.64	27.86	32.39	48.88	32.96
	3.53	10.03	14.16	19.55	32.75	23.62	38.11	39.56	34.89	30.15	32.93	35.65	38.37	55.87	53.71	51.53
Promedio	3.46	9.68	14.72	18.89	27.69	22.80	32.67	32.73	30.47	27.02	29.22	34.77	34.77	47.91	46.96	46.66
Desviación estándar	3.51	9.69	14.36	19.55	28.46	21.94	32.16	35.54	31.90	27.04	30.04	32.69	33.67	45.39	49.85	43.72
	0.04	0.34	0.32	0.66	3.97	2.24	6.22	3.57	2.59	3.10	2.58	4.39	5.34	11.94	3.48	9.63
2000	3.88	9.61	13.36	20.39	32.11	25.30	36.94	42.70	39.75	36.24	51.31	57.42	53.69	60.16	62.14	53.93
	4.08	9.87	16.05	25.96	33.30	26.72	39.35	43.40	43.00	56.37	54.38	60.63	57.46	63.13	67.36	61.91
Promedio	3.66	9.42	11.78	18.83	21.80	23.78	33.37	41.97	38.88	51.56	50.40	45.64	45.87	43.74	59.99	57.79
Desviación estándar	3.87	9.63	13.73	21.73	29.07	25.27	36.55	42.69	40.54	48.06	52.03	54.56	52.34	55.68	63.16	57.88
	0.21	0.23	2.16	3.75	6.32	1.47	3.01	0.72	2.17	10.51	2.09	7.89	5.91	10.45	3.79	3.99
	Lípidos(mg g⁻¹)															
900	14.06	23.18	22.48	17.98	21.95	20.46	20.57	16.17	19.65	15.51	22.78	21.11	25.10	32.01	33.64	33.14
	16.71	21.36	25.30	25.42	29.98	18.93	22.69	21.35	16.19	16.65	20.62	17.94	20.69	23.44	29.97	27.05
Promedio	18.71	20.02	28.30	23.68	22.89	17.44	19.38	18.49	14.10	14.79	15.63	14.87	20.21	25.94	29.75	26.31
Desviación estándar	16.50	21.52	25.36	22.36	24.94	18.95	20.88	18.67	16.65	15.65	19.68	17.97	22.00	27.13	31.12	28.83
	2.33	1.59	2.91	3.89	4.39	1.51	1.68	2.59	2.80	0.94	3.67	3.12	2.69	4.41	2.18	3.75
1500	11.46	22.51	27.96	24.81	26.03	19.13	19.47	23.94	18.58	14.51	16.72	16.45	19.48	21.17	34.92	22.89
	12.10	26.56	26.29	23.97	35.27	20.41	29.78	28.81	21.99	18.50	19.84	21.13	26.10	36.51	39.50	36.55

	11.85	26.93	27.74	23.62	29.82	20.21	26.35	24.43	19.36	16.48	17.63	20.35	23.34	32.37	34.78	32.56
Promedio	11.80	25.33	27.33	24.13	30.38	19.92	25.20	25.73	19.98	16.50	18.06	19.31	22.97	30.02	36.40	30.67
Desviación estándar	0.32	2.45	0.91	0.62	4.65	0.69	5.25	2.68	1.78	1.99	1.60	2.51	3.32	7.94	2.68	7.02
	16.28	19.83	20.20	25.04	33.05	25.30	32.03	33.71	27.61	24.82	34.43	38.03	40.06	44.90	44.70	40.25
2000	15.59	23.33	25.13	29.55	33.78	26.34	31.23	34.82	28.99	37.83	36.13	39.62	41.64	40.47	51.03	46.90
	13.98	21.62	17.21	20.28	22.78	23.12	26.34	33.31	25.52	33.70	32.45	28.98	33.48	33.65	43.79	42.49
Promedio	15.29	21.59	20.85	24.95	29.87	24.92	29.87	33.95	27.37	32.12	34.34	35.54	38.39	39.67	46.51	43.21
Desviación estándar	1.18	1.75	4.00	4.64	6.15	1.64	3.08	0.78	1.74	6.65	1.84	5.74	4.33	5.67	3.94	3.38

Los promedios para cada una de las DFFFA, presentes en la Tabla 18, fueron graficados obteniéndose de esta forma la curva de crecimiento de la microalga y el cambio en el contenido de lípidos de la misma.

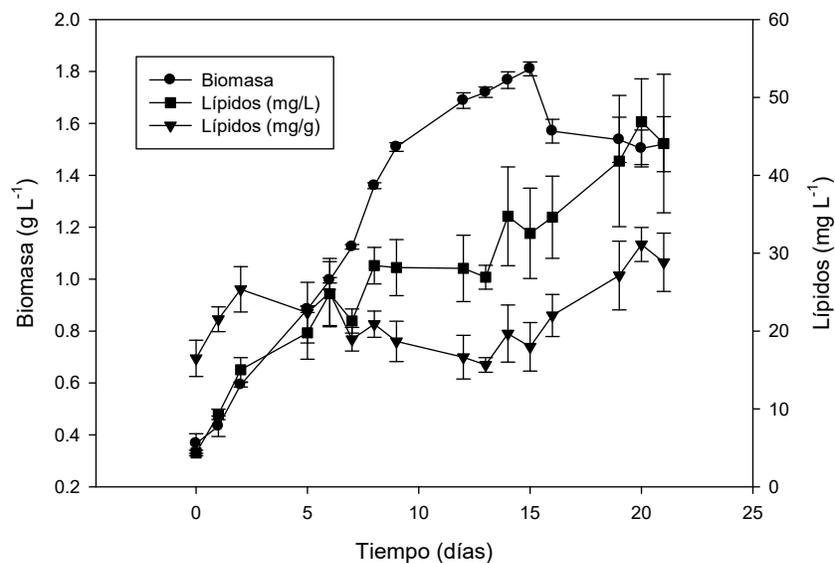


Figura 31. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

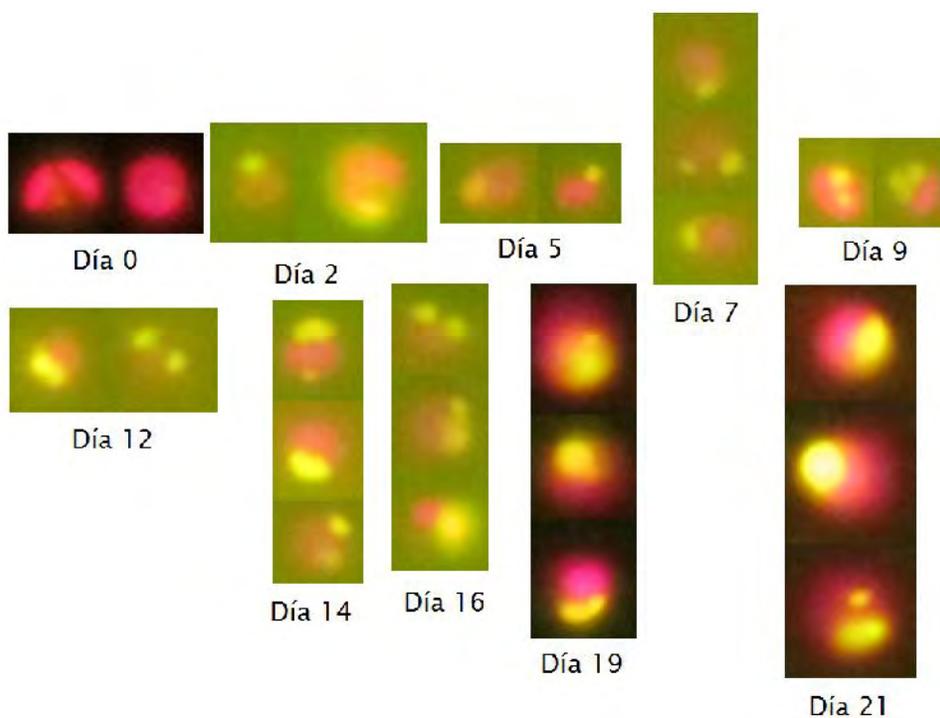


Figura 32. Tinción con Rojo Nilo de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $900 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

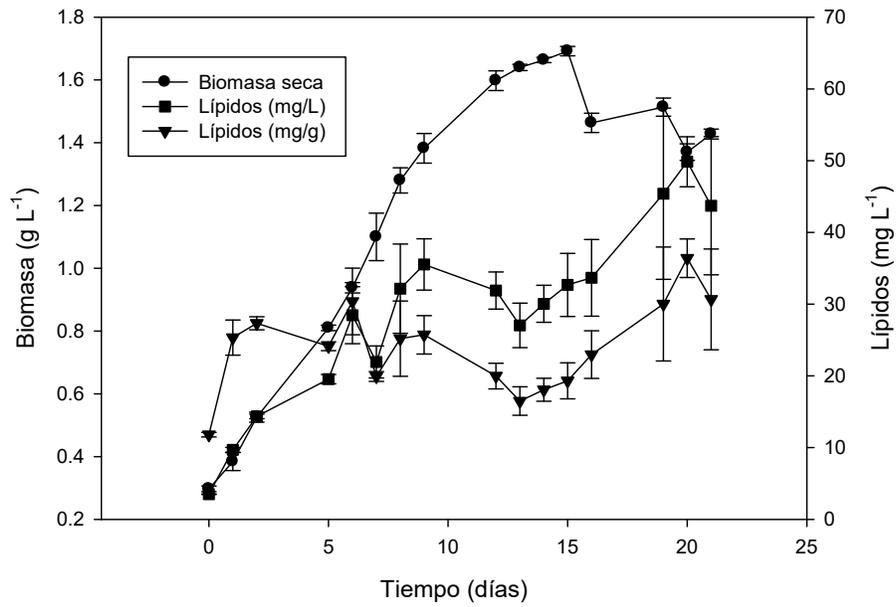


Figura 33. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

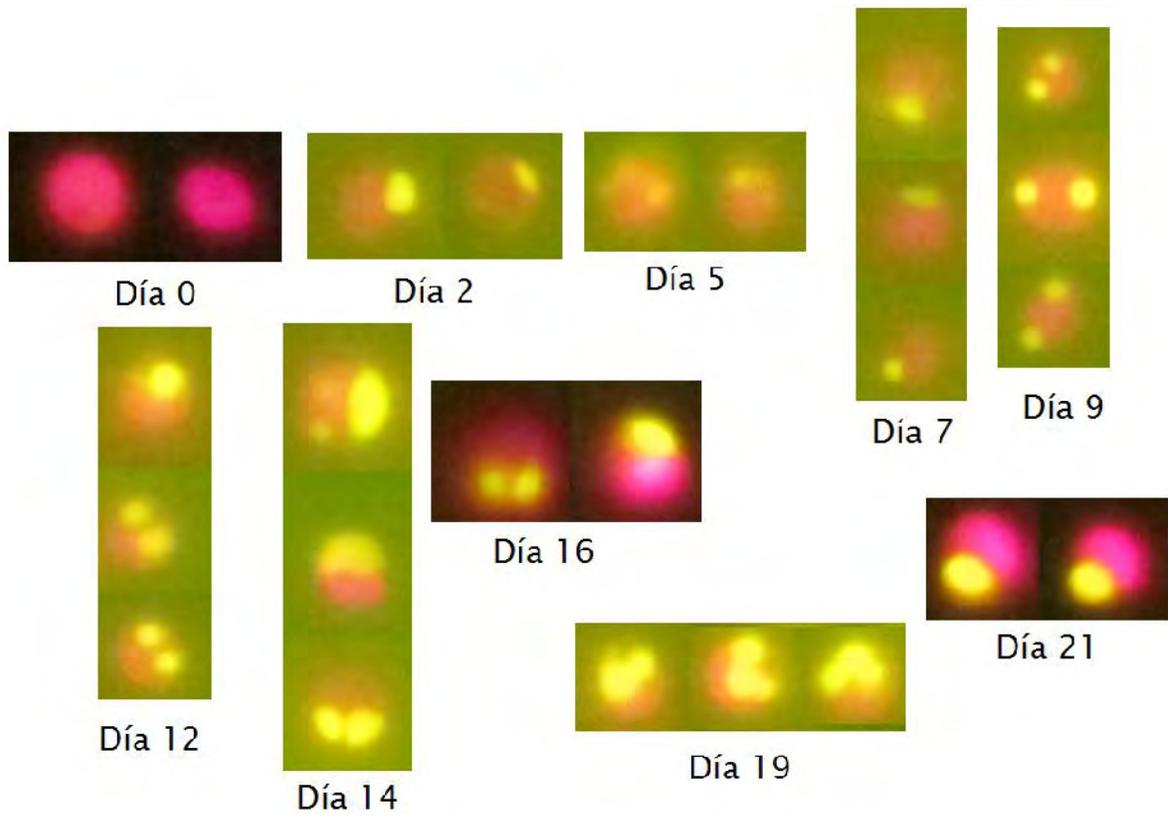


Figura 34. Tinción con Rojo Nilo de *Nannochloropsis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

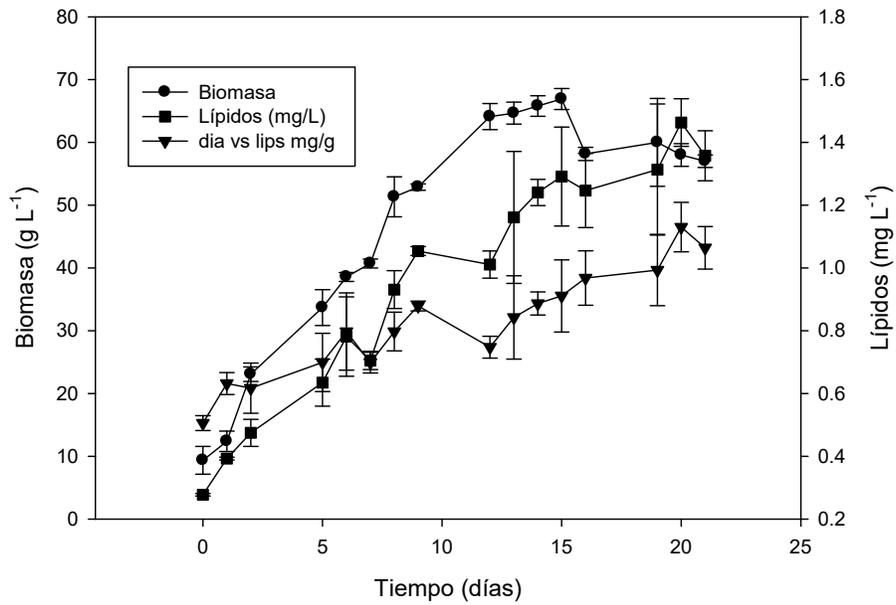


Figura 35. Contenido de biomasa seca y lípidos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

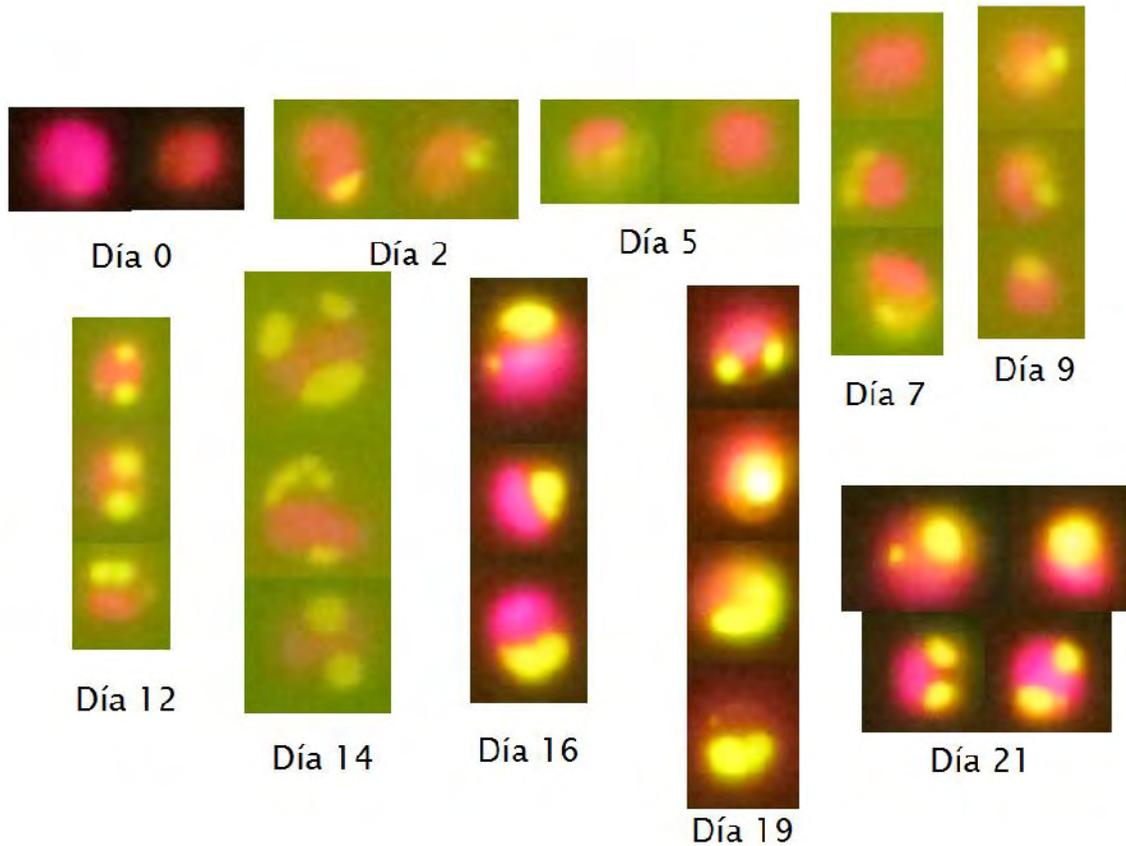


Figura 36. Tinción con Rojo Nilo de *Nannochloropsis* sp. a $2000 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En los cultivos a las 3 diferentes DFFFA (900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hay un comportamiento similar en cuanto al contenido de biomasa y lípidos, se observa que la fase estacionaria se alcanza alrededor del día 12 (Figura 31, Figura 33 y Figura 35), empezándose a ver un aumento del contenido de lípidos, tanto en el cultivo como en la biomasa, hasta el día 15. El contenido máximo de lípidos se alcanza al día 20 donde ya existía una disminución en la cantidad de biomasa, debido a que la fase de muerte se alcanzó en este mismo día. Se aprecia que tanto en el contenido de lípidos en el cultivo como en la biomasa, hay un aumento de los mismos durante la fase estacionaria de cultivo.

Mediante la tinción con Rojo Nilo (Figura 32, Figura 34 y Figura 36) se puede observar que hay cuerpos lipídicos desde el inicio de los cultivos al día 2, sin embargo, a partir del día 12 se observa un aumento en la cantidad de cuerpos lipídicos dentro de la microalga.

Se graficaron tanto la biomasa como los lípidos presentes en los cultivos a las 3 diferentes DFFFA, para realizar una comparación de estos parámetros.

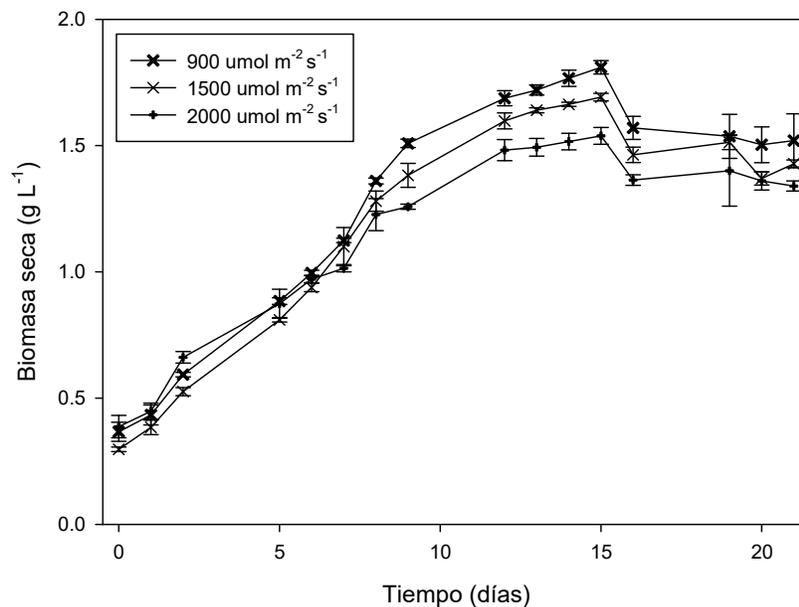


Figura 37. Contenido de biomasa en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a las diferentes DFFFA.

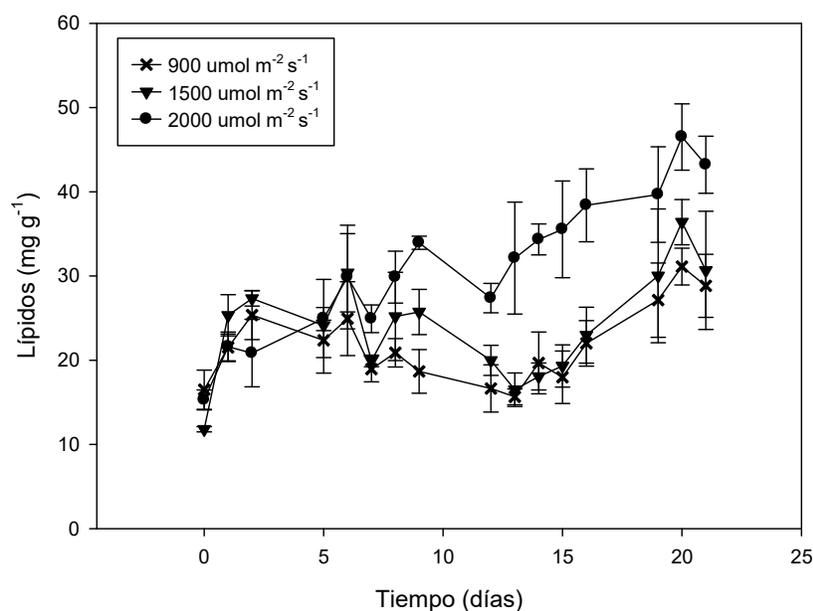


Figura 38. Contenido de lípidos en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a las diferentes DFFFA.

En el caso de la biomasa se observa que el contenido de la misma es muy similar para los cultivos a las 3 diferentes DFFFA, siendo el contenido más alto el del cultivo a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 37), presentándose el mayor contenido de lípidos en los cultivos a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 38).

Con los resultados presentados en la Tabla 18, se calcularon la productividad de biomasa en el día 12 que es cuando acaba la fase logarítmica de crecimiento, la tasa de crecimiento específico y la productividad de lípidos (Tabla 19). Con estos resultados se puede ver que la microalga sometida a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiene la mayor productividad de biomasa y tasa de crecimiento específico ($p < 0.05$). Las productividades de lípidos alcanzadas con las DFFFA de 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fueron similares, siendo la menor con una DFFFA de $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 19. Productividad de biomasa, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos de los cultivos de *Nannochloropsis* sp- a diferentes DFFFA.

DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Productividad de biomasa	Tasa de crecimiento específico	Productividad de lípidos
900	$87.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.164 día^{-1}	$7.69 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$
1500	$99.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.194 día^{-1}	$9.67 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$
2000	$84.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.151 día^{-1}	$9.53 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$

Se realizó la caracterización del agua residual durante todo el cultivo para determinar el contenido de nutrientes en la misma y ver cómo afecta esto al contenido de lípidos y biomasa en el cultivo, primero se muestra el contenido de nitratos, nitritos y nitrógeno amoniacal, además del nitrógeno total que es la suma de las 3 formas de nitrógeno y también se muestra el contenido de ortofosfatos y DQO (Tabla 10).

Si se realiza el análisis estadístico con la concentración de nitrógeno total como factor se obtiene lo mismo que con las otras dos microalgas, es decir, que la concentración de nitrógeno total si tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la productividad de lípidos. En este caso se obtiene que la DFFFA si tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la productividad de lípidos, esto puede deberse a que esta microalga es más sensible a la luz que las dos anteriores. Si se hace un diseño con la DFFFA, la concentración de nitrógeno total y el tiempo como factores, se obtiene que hay una interacción entre el tiempo y la concentración de nitrógeno ($p < 0.05$) y entre el tiempo y la DFFFA ($p < 0.05$). Además se obtiene que tanto el tiempo como la concentración de nitrógeno total y la DFFFA tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la productividad de lípidos.

Tabla 20. Concentración de nitrógeno, ortofosfatos y DQO en los cultivos de *Nannochloropsis* sp.

Día	0	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	19	20	21
DFFFA ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Nitritos (mg L^{-1})															
900	10.24	9.86	9.47	11.03	13.77	13.25	12.51	12.90	10.35	6.79	3.31	1.29	1.62	0.10	0.23	1.19
	10.18	11.09	12.90	12.80	15.09	15.19	13.96	12.74	12.19	10.80	4.37	1.80	1.35	0.10	0.85	0.52
	10.83	10.22	10.96	11.77	15.32	14.96	12.80	12.64	15.29	13.48	6.77	2.89	2.73	1.36	1.76	0.13
Promedio	10.42	10.39	11.11	11.87	14.73	14.47	13.09	12.76	12.61	10.36	4.81	1.99	1.90	0.52	0.95	0.61
Desviación estándar	0.36	0.63	1.72	0.89	0.84	1.06	0.77	0.13	2.50	3.36	1.77	0.82	0.74	0.73	0.77	0.53
1500	10.50	9.47	9.54	10.99	13.96	14.83	13.87	14.41	15.29	14.16	6.97	0.99	3.11	1.73	1.61	1.16
	10.79	7.57	7.47	7.47	9.89	8.73	7.81	6.95	3.15	1.14	0.51	0.24	0.36	< 0.10	0.11	< 0.10
	10.83	9.44	8.34	11.64	10.44	11.80	10.86	8.93	6.63	7.54	2.02	2.86	0.57	2.77	0.27	0.17
Promedio	10.71	8.83	8.45	10.03	11.43	11.79	10.85	10.10	8.36	7.61	3.17	1.36	1.35	1.53	0.66	0.47
Desviación estándar	0.18	1.09	1.04	2.24	2.21	3.05	3.03	3.87	6.25	6.51	3.38	1.35	1.53	1.34	0.82	0.59
2000	10.47	7.92	6.89	8.21	9.89	9.38	6.44	6.99	3.24	0.10	0.18	0.18	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
	10.54	7.63	7.54	9.96	8.92	8.47	4.92	3.30	1.40	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
	10.31	7.63	6.66	8.96	8.38	8.18	7.28	8.80	5.63	7.54	3.88	1.83	2.12	3.03	2.95	0.38
Promedio	10.44	7.73	7.03	9.04	9.06	8.68	6.21	6.36	3.42	2.58	1.39	0.70	0.77	1.08	1.05	0.19
Desviación estándar	0.12	0.17	0.45	0.87	0.77	0.62	1.19	2.80	2.12	4.30	2.16	0.98	1.17	1.69	1.65	0.16
	Nitratos (mg L^{-1})															
900	44.94	26.30	24.92	25.62	19.89	18.70	21.01	19.26	10.36	9.46	5.77	6.19	3.40	1.16	1.00	6.48
	46.72	15.04	18.18	18.95	18.84	16.56	13.15	13.33	13.75	14.85	10.50	12.36	11.59	7.56	5.92	4.24
	45.74	16.00	18.33	19.77	22.97	17.33	19.08	22.56	17.01	18.46	10.98	16.71	14.48	10.36	7.77	< 1.00
Promedio	45.80	19.12	20.48	21.45	20.56	17.53	17.75	18.38	13.70	14.26	9.08	11.75	9.83	6.36	4.90	3.91

Desviación estándar	0.89	6.24	3.85	3.64	2.15	1.08	4.10	4.68	3.33	4.53	2.88	5.29	5.75	4.72	3.50	2.76
1500	45.20	19.21	21.62	20.90	19.83	21.62	12.83	17.08	15.798	19.37	10.81	18.01	15.02	12.00	11.94	11.14
	46.23	14.90	26.33	19.09	13.65	11.29	9.87	8.72	7.1977	6.70	5.11	4.75	3.63	1.91	< 1.00	< 1.00
Promedio	44.16	18.48	23.58	21.62	19.19	15.99	17.41	17.50	16.762	14.51	15.09	9.51	13.39	8.16	10.85	10.54
Desviación estándar	45.20	17.53	23.84	20.53	17.56	16.30	13.37	14.43	13.25	13.53	10.34	10.76	10.68	7.36	7.93	7.56
	1.04	2.31	2.37	1.31	3.40	5.17	3.80	4.95	5.27	6.40	5.01	6.72	6.16	5.10	6.02	5.69
2000	44.06	22.47	20.60	22.93	23.08	11.94	8.47	7.24	1.00	1.18	1.00	1.00	1.56	< 1.00	< 1.00	< 1.00
	45.79	23.36	29.76	23.88	14.37	8.55	5.28	3.99	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Promedio	45.01	19.09	22.62	26.00	18.94	15.93	15.19	12.56	11.30	12.51	11.40	11.68	8.51	2.68	1.58	< 1.00
Desviación estándar	44.95	21.64	24.33	24.27	18.79	12.14	9.65	7.93	4.43	4.89	4.47	4.56	3.69	1.56	1.19	< 1.00
	0.86	2.25	4.81	1.57	4.36	3.69	5.06	4.33	5.95	6.59	6.01	6.17	4.18	0.97	0.34	0.00
Nitrógeno amoniacal (mg L⁻¹)																
900	30.04	2.67	6.61	4.29	0.53	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	29.51	8.29	4.43	4.89	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Promedio	29.56	4.80	0.90	1.13	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Desviación estándar	29.71	5.25	3.98	3.44	0.51	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	0.29	2.84	2.89	2.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1500	29.49	5.83	0.50	0.64	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	30.90	5.70	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Promedio	29.14	6.84	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Desviación estándar	29.84	6.12	0.50	0.55	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
	0.93	0.62	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2000	30.65	6.71	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	31.64	9.03	2.06	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50

	30.10	9.32	2.64	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Promedio	30.80	8.35	1.73	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Desviación estándar	0.78	1.43	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrógeno total (mg L⁻¹)																
	85.23	38.83	41.01	40.94	34.18	32.45	34.02	32.65	21.20	16.76	9.58	7.98	5.52	1.76	1.73	8.17
900	86.41	34.42	35.50	36.64	34.43	32.25	27.61	26.56	26.43	26.15	15.37	14.65	13.44	8.16	7.27	5.26
	86.13	31.02	30.18	32.66	38.79	32.79	32.38	35.70	32.80	32.44	18.25	20.11	17.72	12.23	10.03	1.63
Promedio	85.92	34.76	35.57	36.75	35.80	32.50	31.34	31.64	26.81	25.12	14.40	14.25	12.23	7.38	6.34	5.02
Desviación estándar	0.62	3.92	5.42	4.14	2.59	0.28	3.33	4.65	5.80	7.89	4.42	6.07	6.19	5.28	4.22	3.28
	85.19	34.52	31.66	32.53	34.29	36.95	27.20	32.00	31.58	34.03	18.29	19.50	18.63	14.23	14.05	12.80
1500	87.93	28.17	34.30	27.06	24.04	20.52	18.18	16.17	10.85	8.34	6.11	5.49	4.49	2.49	1.61	1.55
	84.12	34.76	32.43	33.76	30.13	28.29	28.77	26.93	23.89	22.55	17.61	12.87	14.46	11.43	11.62	11.20
Promedio	85.75	32.48	32.80	31.11	29.49	28.59	24.72	25.03	22.11	21.64	14.00	12.62	12.53	9.39	9.09	8.52
Desviación estándar	1.96	3.74	1.36	3.57	5.16	8.22	5.72	8.08	10.48	12.87	6.84	7.01	7.26	6.13	6.59	6.08
	85.18	37.10	27.99	31.65	33.47	21.81	15.40	14.72	4.74	1.78	1.68	1.68	2.16	1.60	1.60	1.60
2000	87.96	40.02	39.35	34.34	23.79	17.52	10.70	7.79	2.90	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
	85.42	36.05	31.92	35.46	27.81	24.61	22.97	21.86	17.43	20.55	15.79	14.01	11.13	6.20	5.03	1.88
Promedio	86.19	37.72	33.09	33.81	28.36	21.31	16.36	14.79	8.36	7.97	6.35	5.76	4.96	3.13	2.74	1.69
Desviación estándar	1.54	2.06	5.77	1.96	4.86	3.57	6.19	7.03	7.91	10.89	8.17	7.14	5.35	2.66	1.98	0.16
Ortofosfatos (mg L⁻¹)																
	17.56	16.02	14.85	11.93	9.95	8.39	7.94	6.66	3.28	3.40	1.07	1.60	1.21	0.75	< 0.50	< 0.50
900	16.90	15.75	13.58	9.19	10.36	10.24	6.67	4.68	3.71	3.23	1.45	1.02	0.81	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	17.58	16.78	13.58	10.01	11.53	9.62	7.86	6.33	3.86	3.30	2.17	1.46	0.79	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Promedio	17.35	16.18	14.00	10.38	10.61	9.42	7.49	5.89	3.62	3.31	1.56	1.36	0.94	0.58	0.50	0.50

Desviación estándar	0.39	0.53	0.73	1.41	0.82	0.95	0.71	1.06	0.30	0.08	0.56	0.31	0.24	0.15	0.00	0.00
1500	17.66	15.55	16.05	10.02	12.17	11.44	9.34	5.72	4.07	3.23	3.22	1.04	0.94	0.56	< 0.50	< 0.50
	17.32	15.37	13.58	9.19	9.58	7.20	4.97	4.03	2.29	1.39	0.99	0.82	0.59	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	17.83	16.07	13.58	9.19	11.61	8.48	8.37	5.30	2.93	2.19	0.91	0.92	0.87	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Promedio	17.60	15.66	14.40	9.47	11.12	9.04	7.56	5.02	3.10	2.27	1.71	0.92	0.80	0.52	0.50	0.50
Desviación estándar	0.26	0.36	1.43	0.48	1.36	2.18	2.30	0.88	0.90	0.92	1.32	0.11	0.19	0.04	0.00	0.00
2000	18.12	16.95	13.58	12.99	11.71	9.32	7.63	6.08	2.62	1.69	1.93	0.89	0.83	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	17.39	16.31	16.92	11.24	11.63	7.33	6.50	5.46	2.90	1.88	1.42	0.95	0.89	< 0.50	< 0.50	< 0.50
	18.02	15.46	15.48	12.77	12.51	8.82	7.74	6.65	3.39	2.14	2.28	1.95	1.12	0.77	< 0.50	< 0.50
Promedio	17.84	16.24	15.33	12.33	11.95	8.49	7.29	6.06	2.97	1.90	1.88	1.26	0.94	0.59	0.50	0.50
Desviación estándar	0.40	0.75	1.68	0.96	0.49	1.03	0.69	0.60	0.39	0.23	0.43	0.60	0.15	0.16	0.00	0.00
Demanda Química de Oxígeno (mg O₂ L⁻¹)																
900	270.50	268.50	228.50	199.50	183.50	183.50	163.50	153.50	123.50	103.50	78.50	73.50	57.50	51.50	<50.00	<50.00
	272.50	233.50	233.50	203.50	193.50	184.50	177.50	141.50	128.50	106.50	97.50	85.50	66.50	52.50	<50.00	<50.00
	265.50	238.50	220.50	217.50	195.50	183.50	178.50	168.50	156.50	113.50	93.50	76.50	61.50	51.50	<50.00	<50.00
Promedio	269.50	246.83	227.50	206.83	190.83	183.83	173.17	154.50	136.17	107.83	89.83	78.50	61.83	51.83	50.00	50.00
Desviación estándar	3.61	18.93	6.56	9.45	6.43	0.58	8.39	13.53	17.79	5.13	10.02	6.24	4.51	0.58	0.00	0.00
1500	265.50	268.50	209.50	202.50	187.50	158.50	118.50	98.50	88.50	83.50	73.50	58.50	51.50	<50.00	<50.00	<50.00
	255.50	246.50	243.50	233.50	178.50	173.50	163.50	128.50	118.50	108.50	97.50	73.50	53.50	<50.00	<50.00	<50.00
	269.50	268.50	243.50	203.50	191.50	173.50	158.50	137.50	123.50	111.50	99.50	83.50	58.50	<50.00	<50.00	<50.00
Promedio	263.50	261.17	232.17	213.17	185.83	168.50	146.83	121.50	110.17	101.17	90.17	71.83	54.50	50.00	50.00	50.00
Desviación estándar	7.21	12.70	19.63	17.62	6.66	8.66	24.66	20.42	18.93	15.37	14.47	12.58	3.61	0.00	0.00	0.00
2000	273.50	233.50	218.50	208.50	138.50	123.50	118.50	103.50	78.50	58.50	57.50	51.50	50.00	50.00	<50.00	<50.00
	277.50	283.50	258.50	238.50	200.50	177.50	173.50	153.50	118.50	113.50	103.50	98.50	77.50	53.50	<50.00	<50.00

	275.50	258.50	268.50	208.50	188.50	187.50	181.50	168.50	145.50	113.50	99.50	88.50	73.50	55.50	<50.00	<50.00
Promedio	275.50	258.50	248.50	218.50	175.83	162.83	157.83	141.83	114.17	95.17	86.83	79.50	67.00	53.00	50.00	50.00
Desviación estándar	2.00	25.00	26.46	17.32	32.88	34.43	34.30	34.03	33.71	31.75	25.48	24.76	14.86	2.78	0.00	0.00

Los datos contenidos en la Tabla 20 se graficaron para ver la disminución en la concentración de nutrientes del medio de cultivo, el nitrógeno se graficó como nitrógeno total.

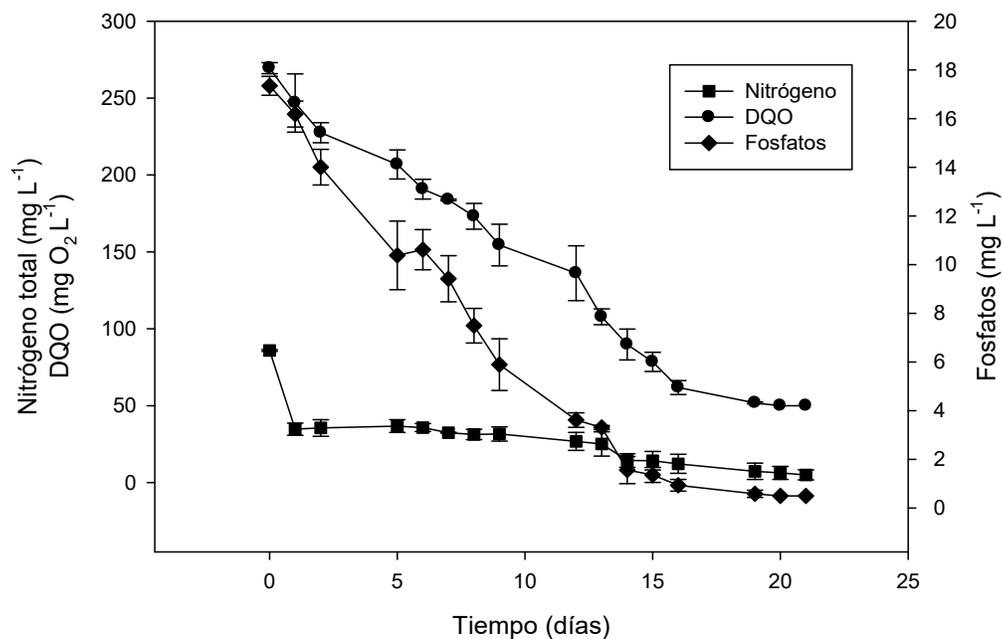


Figura 39. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

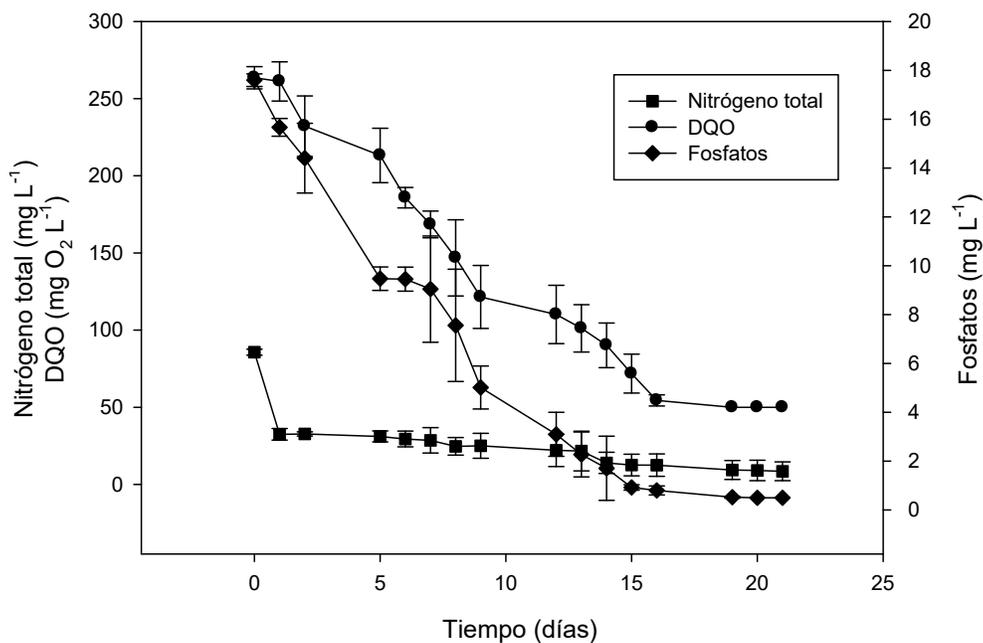


Figura 40. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

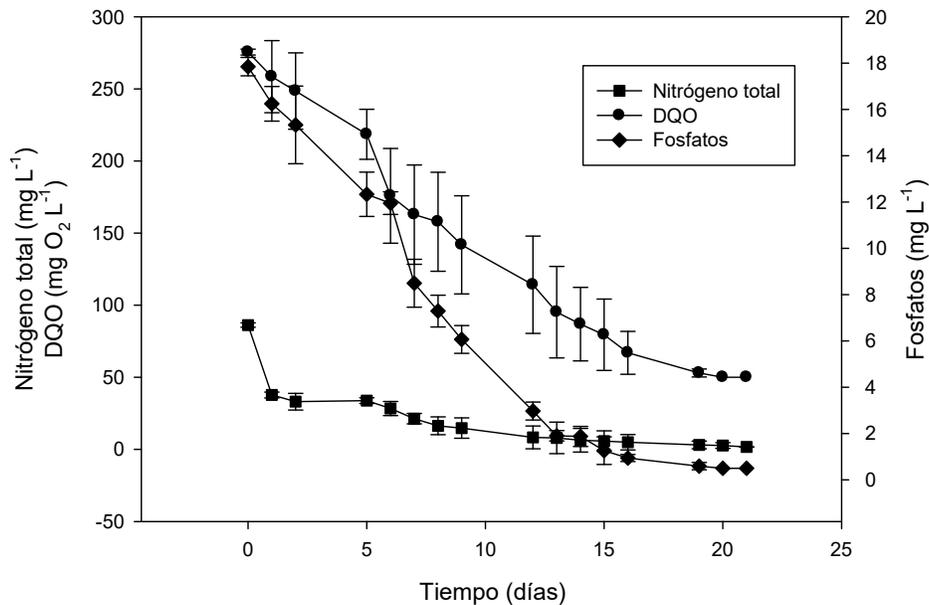


Figura 41. Perfil de consumo de nutrientes en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el caso de los cultivos a las 3 diferentes DFFFA (900 , 1500 y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), hay un comportamiento similar en la remoción de nutrientes, en el día 12 ya se comienzan a tener bajas concentraciones de nutrientes (Figura 39, Figura 40 y Figura 41), con lo cual se alcanza la fase estacionaria de crecimiento. Algún tiempo después de que se tienen bajas concentraciones de nutrientes en los cultivos es cuando la concentración de lípidos en las microalgas comienza a aumentar, alrededor del día 15 (Figura 38).

En los cultivos para las 3 diferentes DFFFA, la remoción del nitrógeno total fue mayor al 90 %. Para los ortofosfatos la remoción fue de superior al 95 % para los cultivos sometidos a las 3 DFFFA. Hubo una remoción de DQO cercana al 80 % para los cultivos a las 3 DFFFA.

Las cinéticas de remoción de los contaminantes para los cultivos a las 3 DFFFA fueron muy similares, siendo la remoción de nitrógeno de alrededor de $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}$, la de DQO de $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}$ y la de fósforo cercana a los $0.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}$.

Comparación entre los cultivos de las 3 especies de microalgas

En los cultivos de las 3 especies de microalgas (*Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp.), los pH del efluente cumplen con los de los estándares mostrados en la Tabla 2, los cuales se encuentran entre 7.5 y 8.3. En todos los casos se cumple con los límites de nitrógeno amoniacal el cual es de 0.5 mg L^{-1} , en la Tabla 2 el límite es de 3 mg L^{-1} . En el caso de los ortofosfatos, el efluente alcanza concentraciones de 0.5 mg L^{-1} , siendo este el límite de detección del método por lo que no se puede saber si cumpliría con el

estándar mostrado en la Tabla 2 que es de 0.3 mg L^{-1} . Lo mismo sucede para la DQO cuyo límite de detección es de 50 mg L^{-1} , aunque en los estándares de la Tabla 2 el valor que se muestra es de DBO_5 , cumpliría con el estándar del IFC que es de 50 mg L^{-1} , pero no con el del GAA que es de 50 mg L^{-1} . Para el caso del oxígeno disuelto el estándar marcado en la Tabla 2 es de 5 mg L^{-1} y en casi todos los casos el efluente tiene concentraciones mayores a este valor por lo que si cumple con los estándares.

Se graficaron la biomasa y lípidos a cada una de las 3 DFFFA por separado ($900, 1500$ y $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para las 3 especies de microalgas para poder hacer una comparación entre ellas.

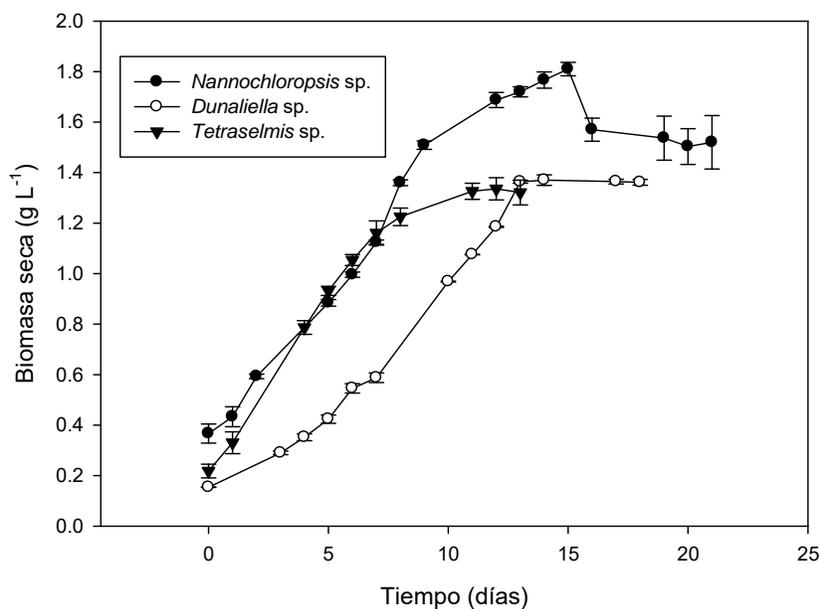


Figura 42. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

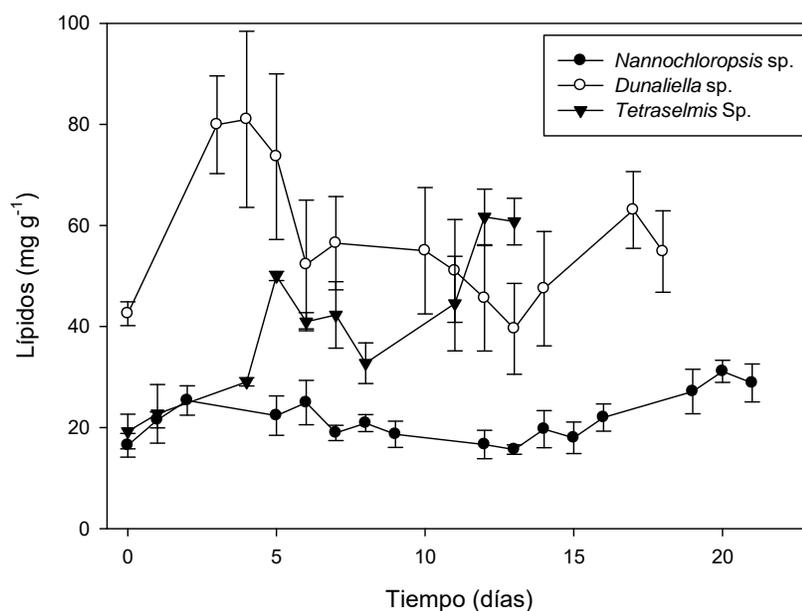


Figura 43. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el caso de los cultivos a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa un contenido de biomasa muy similar en los casos de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp., siendo el contenido de biomasa de estos menor al de *Nannochloropsis* sp. (Figura 42). En el caso de los lípidos también se tiene un contenido de los mismos muy similar para el caso de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp., en este caso siendo mayores que el contenido para los cultivos de *Nannochloropsis* sp. (Figura 43).

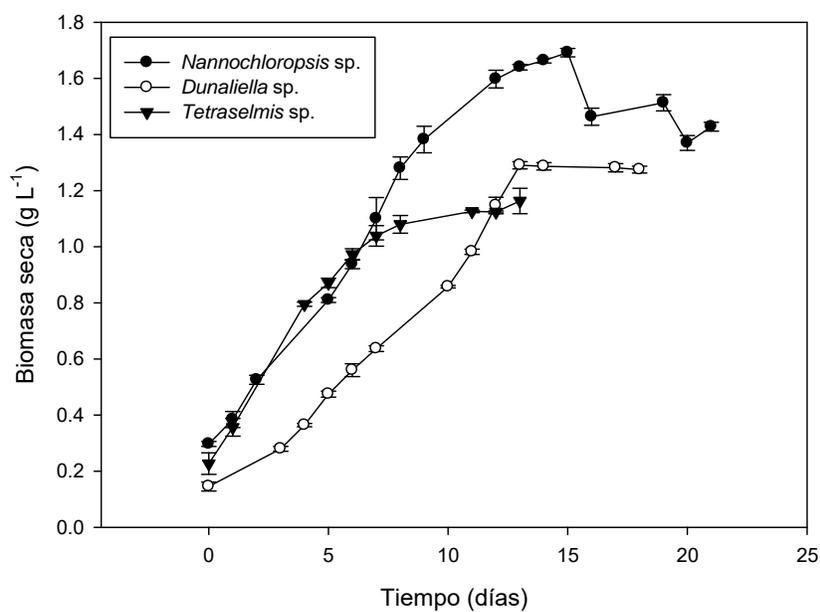


Figura 44. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

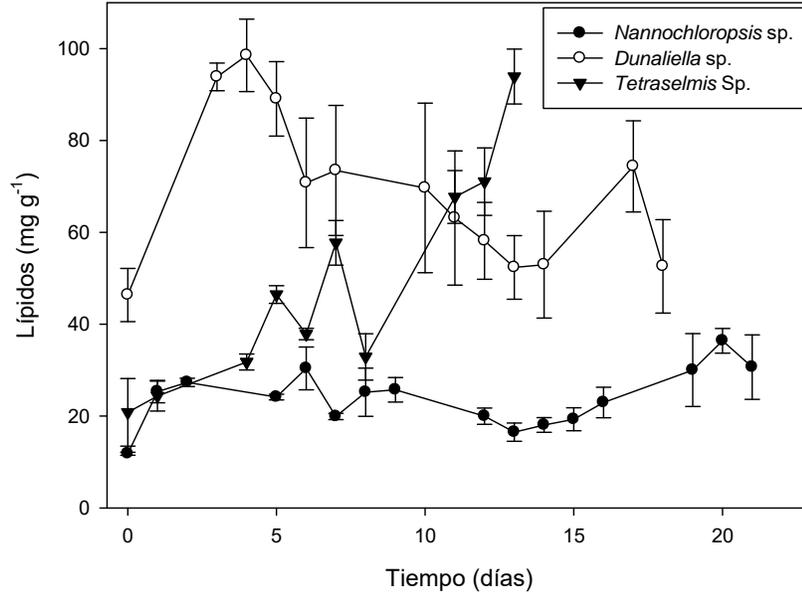


Figura 45. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para los cultivos a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa nuevamente que el contenido de biomasa en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. es mayor que para los cultivos de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp. (Figura 44). El mayor contenido de lípidos en este caso se obtuvo para los cultivos de *Tetraselmis* sp. (Figura 45).

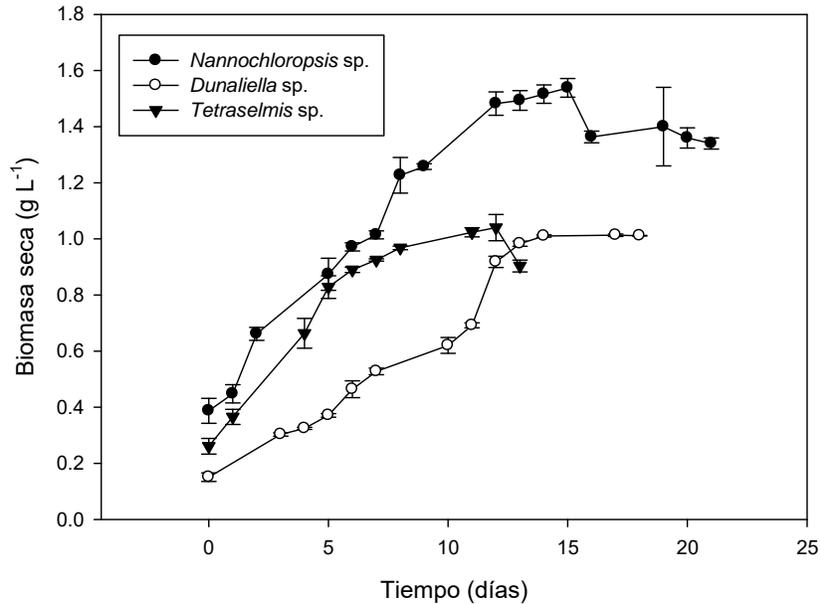


Figura 46. Contenido de biomasa en los cultivos de las 3 microalgas a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

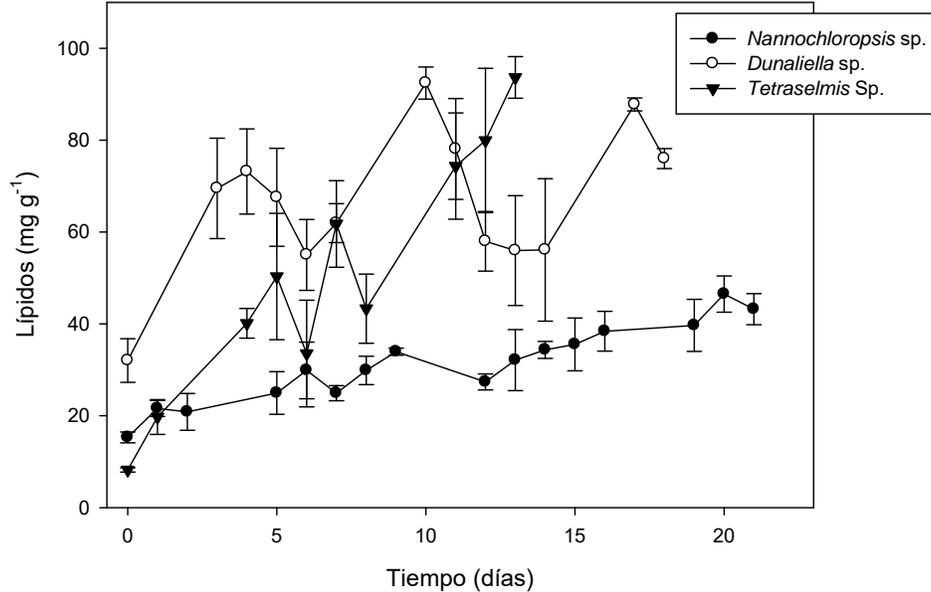


Figura 47. Contenido de lípidos en los cultivos de las 3 microalgas a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el caso de los cultivos a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocurre algo similar que en los cultivos a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde el contenido de biomasa de los cultivos de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp. es muy similar, siendo menor al del cultivo de *Nannochloropsis* sp. (Figura 46). Para el contenido de lípidos, se tienen valores similares en los cultivos de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp., siendo mayores al contenido obtenido para el cultivo de *Nannochloropsis* sp. (Figura 47).

En la Tabla 21 se pueden observar los datos comparativos de las 3 especies de microalgas (*Tetraselmis*, *Dunaliella* y *Nannochloropsis*). Aquí se puede apreciar que la productividad de biomasa no está relacionada con la productividad de lípidos debido a que *Dunaliella* tuvo las menores productividades de biomasa, sin embargo fue *Nannochloropsis* la que tuvo las menores productividades de lípidos. La microalga que tuvo las mayores productividades tanto de lípidos como de biomasa fue *Tetraselmis*, esto se debió principalmente a que los cultivos de esta microalga fueron los que duraron menor tiempo. La mayor productividad de lípidos se obtuvo para los cultivos de *Tetraselmis* a la DFFFA de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 21. Comparación de cinéticas de remoción de nutrientes, productividades de biomasa y lípidos y tasas de crecimiento específico para las 3 especies de microalgas.

DFFFA	Microalga	Cinética de remoción (mg L ⁻¹ día ⁻¹)			Tasa de crecimiento específico (día ⁻¹)	Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	
		Nitrógeno	DQO	Ortofosfatos		Biomasa	Lípidos
900 μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>Tetraselmis</i>	7.07	20.11	1.49	0.305	134.1	23.031.90
	<i>Dunaliella</i>	3.5	17.35	0.87	0.191	68.9	16.43
	<i>Nannochloropsis</i>	3.85	10.45	0.78	0.164	87.9	7.69
1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>Tetraselmis</i>	7.25	19.34	1.48	0.298	128.0	31.29
	<i>Dunaliella</i>	3.57	17.99	0.94	0.201	69.3	19.42
	<i>Nannochloropsis</i>	3.68	10.17	0.81	0.194	99.5	9.67
2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>Tetraselmis</i>	7.34	14.08	1.48	0.238	103.8	21.52
	<i>Dunaliella</i>	3.51	16.71	0.89	0.172	52.1	14.84
	<i>Nannochloropsis</i>	4.02	10.74	0.83	0.151	84.9	9.53

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para las 3 especies de microalgas usando la DFFFA, la concentración de nitrógeno total y la especie de microalga como factores.

Al realizar el análisis con el modelo completo se obtiene que no hay interacción entre ninguno de los factores y que únicamente la especie de microalga tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la productividad de lípidos. Esto quiere decir que por lo menos alguna de las especies de microalgas tiene una productividad de lípidos significativamente diferente y que los tratamientos en cuanto a DFFFA y concentración de nitrógeno total no tienen diferencias significativas entre las 3 especies de microalgas.

Para determinar si los tratamientos con las diferentes especies de microalgas difieren entre sí o hay tratamientos que no son significativamente diferentes se realizó una prueba de Tukey para comparar las diferencias entre las medias de los tratamientos. Los resultados de la prueba de Tukey son que todos los tratamientos son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Porcentaje de lípidos en la biomasa seca de las tres microalgas cultivadas

Se realizó la extracción de lípidos para cada uno de los cultivos realizados, los resultados se presentan en la Tabla 22, Tabla 23 y Tabla 24.

Tabla 22. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de *Tetraselmis* sp.

DFFFA		Lípidos (mg)	Lípidos (g L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Porcentaje de lípidos	Promedio	Desviación estándar
900 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	35.0	0.1957	1.3753	16.83	15.99	0.78
	2	40.4	0.2093	1.2790	15.84		
	3	37.0	0.1778	1.3099	15.29		
1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	46.4	0.2698	1.1780	23.20	27.61	4.34
	2	62.9	0.4212	1.1123	31.87		
	3	50.5	0.3666	1.1991	27.75		
2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	19.1	0.1182	0.9240	13.08	15.87	2.97
	2	20.8	0.1402	0.8821	15.52		
	3	32.1	0.1716	0.9040	18.99		

Tabla 23. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de *Dunaliella* sp.

DFFFA		Lípidos (mg)	Lípidos (g L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Porcentaje de lípidos	Promedio	Desviación estándar
900 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	28.7	0.2446	1.3721	17.83	17.49	0.47
	2	29.6	0.2412	1.3633	17.69		
	3	21.2	0.2286	1.3490	16.95		
1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	65.9	0.2526	1.2877	19.61	23.04	3.06
	2	50.1	0.3220	1.2631	25.49		
	3	25.0	0.3059	1.2739	24.02		
2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	34.9	0.1698	1.0118	16.78	18.45	1.80
	2	36.2	0.1841	1.0103	18.22		
	3	27.0	0.2060	1.0121	20.35		

Tabla 24. Porcentaje de lípidos presente en los cultivos de *Nannochloropsis* sp.

DFFFA		Lípidos (mg)	Lípidos (g L ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Porcentaje de lípidos	Promedio	Desviación estándar
900 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	25.9	0.0565	1.6400	3.44	3.10	0.95
	2	31.3	0.0550	1.4400	3.82		
	3	14.6	0.0300	1.4800	2.02		
1500 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	28.7	0.0530	1.4400	3.68	4.17	0.47
	2	29.6	0.0597	1.4100	4.24		
	3	32.9	0.0660	1.4330	4.61		
2000 μmol m ⁻² s ⁻¹	1	34.9	0.0667	1.3400	4.98	5.73	0.98
	2	36.2	0.0711	1.3200	5.39		
	3	53.0	0.0930	1.3600	6.84		

De los resultados de las tablas anteriores se puede ver que como se había visto anteriormente el mejor resultado se obtuvo con el cultivo de *Tetraselmis* sp. a la DFFFA de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde se obtuvieron un 27.61 ± 4.34 % de lípidos. Los peores resultados se obtuvieron con *Nannochloropsis* sp. donde se obtuvieron porcentajes de lípidos de entre 3 y 5 %.

Cultivo de *Tetraselmis* sp. en mayor volumen

De los resultados obtenidos anteriormente se seleccionó la microalga *Tetraselmis* sp. para realizar la segunda etapa experimental, debido a que con el cultivo de esta microalga se obtuvieron los mayores resultados de productividad tanto de biomasa como de lípidos a una DFFFA de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La microalga se cultivó en un reactor tipo laguna algal de alta tasa (high rate algae pond, HRAP), que consiste en un reactor de forma elipsoidal de 1.1 m de largo por 0.8 m de ancho con una profundidad de 0.1 m. Con lo cual se tiene un volumen de 70 L de cultivo.

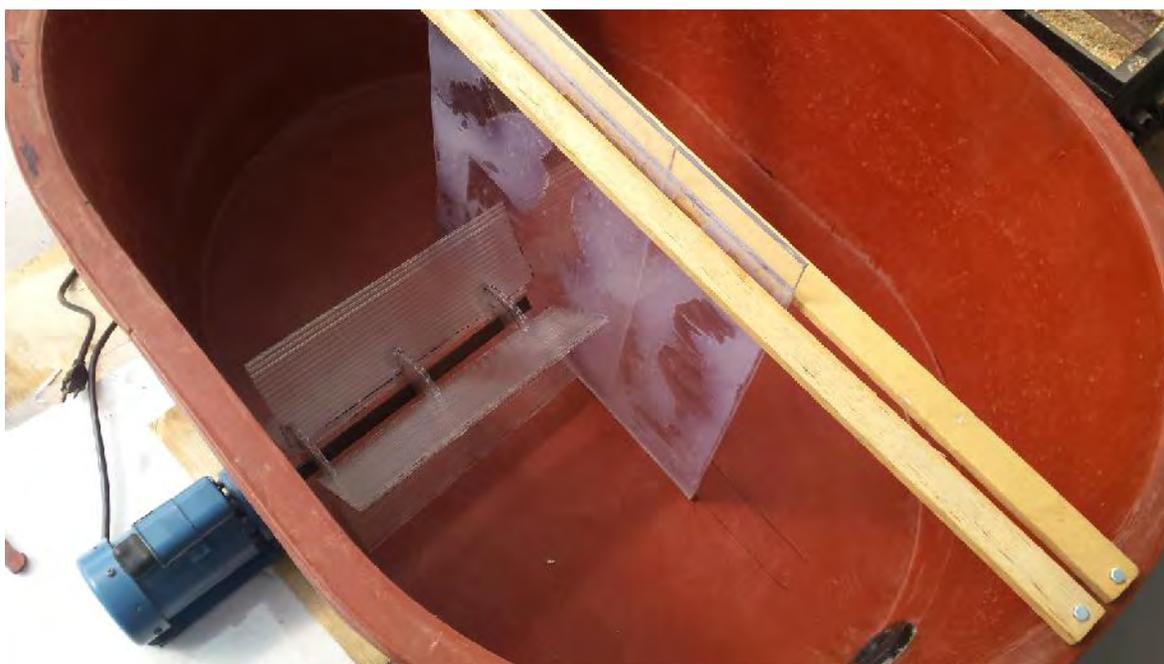


Figura 48. Reactor tipo laguna de alta tasa.



Figura 49. Cultivo de *Tetraselmis* sp. en el reactor tipo laguna de alta tasa.

Se utilizó el mismo medio de cultivo que en la primera etapa experimental el cual consistió en un agua residual sintética con las siguientes concentraciones de nutrientes: 45 mg L⁻¹ de nitratos, 10 mg L⁻¹ de nitritos, 30 mg L⁻¹ de amonio, 17 mg L⁻¹ de ortofosfatos y 270 mg O₂ L⁻¹ de DQO.

El cultivo se mantuvo con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con una DFFFA de 1500 μmol m⁻² s⁻¹. La temperatura varió entre 21 y 26 °C. El cultivo se mantuvo con agitación constante.

En esta etapa se mantiene el cultivo hasta la fase exponencial y una vez que se ha alcanzado la máxima producción de lípidos, se retira la mitad del volumen de cultivo (35 L) y se adicionan otros 35 L de agua residual sintética, para tener un cultivo semicontinuo de la microalga. Este procedimiento inició en el día 63.

En la Figura 50 se puede observar la variación de pH durante el tiempo de cultivo.

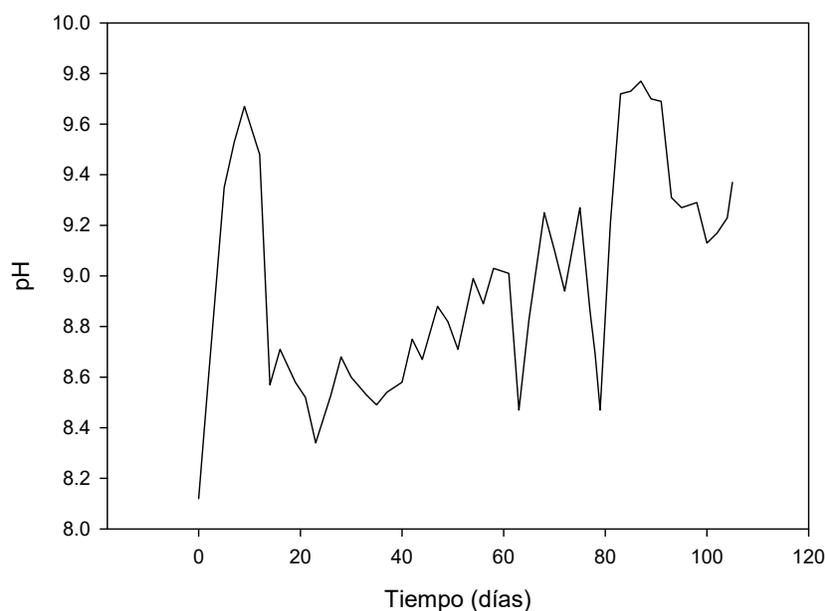


Figura 50. Variación del pH durante el cultivo de *Tetraselmis* sp.

En la Figura 50 se puede observar al inicio del cultivo un aumento del pH, lo cual puede deberse al crecimiento de la microalga. Sin embargo después hubo una reducción del pH y comenzó a subir lentamente, al igual que el crecimiento de la microalga. La reducción del pH que se da después del día 60 se debe a la adición de medio de cultivo y posteriormente vuelve a aumentar por el crecimiento de la microalga. Al final del cultivo el pH desciende ya que la microalga se encontraba en su fase de muerte.

La cantidad de biomasa presente en el medio de cultivo se determinó tanto por densidad óptica a 680 nm, como mediante la determinación del peso seco, estos datos pueden observarse en la Figura 51.

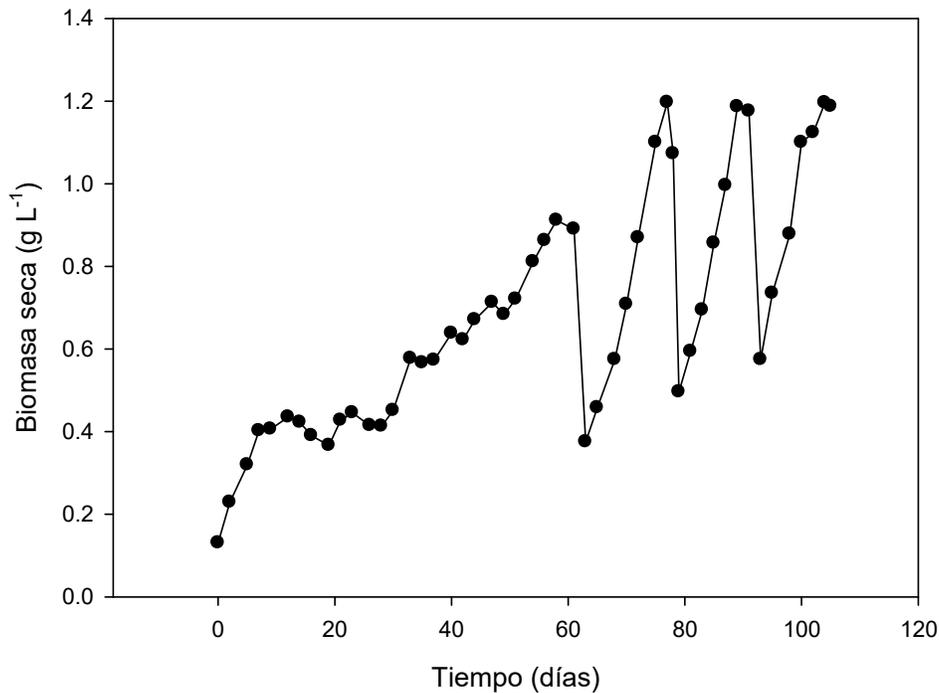


Figura 51. Concentración de biomasa en el cultivo de *Tetraselmis* sp. en pequeña laguna simulando una laguna de oxidación de alta tasa

Se puede ver que el comportamiento no es similar al cultivo a nivel matraz, donde se tenían fases estacionarias que duraban alrededor de 4 días, aquí cuando el alga llega a su máxima cantidad de biomasa comienza la fase de muerte casi instantáneamente, por lo que no se pudo determinar cómo era la acumulación de lípidos durante la fase estacionaria de cultivo. Además de que el cultivo se hizo en un mayor volumen, los reactores utilizados en la primera etapa experimental y en ésta son diferentes, lo cual puede repercutir en la exposición a la luz de la microalga. Al ser un volumen mayor de agua, no se alcanzaban las mismas temperaturas que a nivel matraz, siendo la temperatura del medio de cultivo de esta etapa experimental menor que en la primera lo cual también afectó el crecimiento de la microalga.

La cantidad de lípidos se midió en la biomasa de la microalga lo cual se observa en la Figura 52.

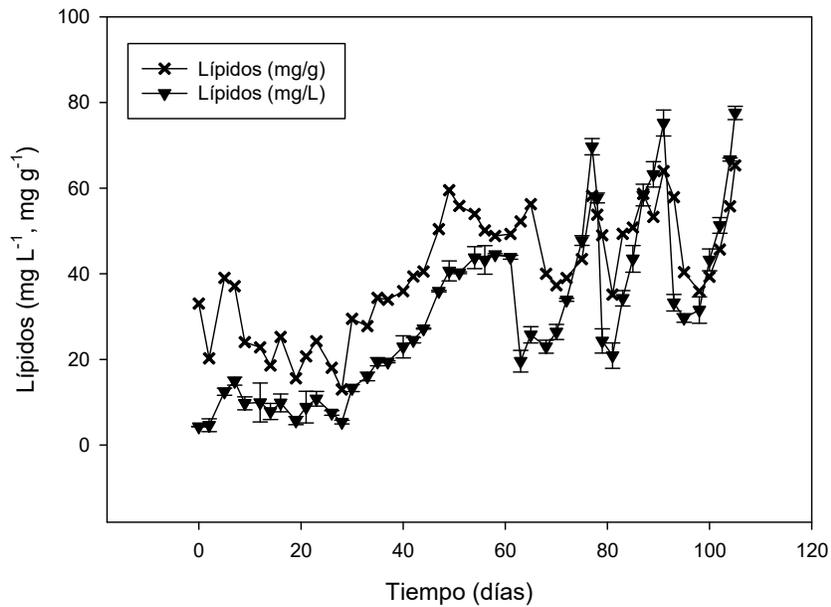


Figura 52. Concentración de lípidos en el cultivo de *Tetraselmis* sp. en pequeña laguna simulando una laguna de oxidación de alta tasa

Durante el cultivo se determinó la concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal. La suma de estas 3 formas de nitrógeno se tomó como el nitrógeno total presente en el cultivo. La reducción de este nutriente se puede observar en la Figura 53.

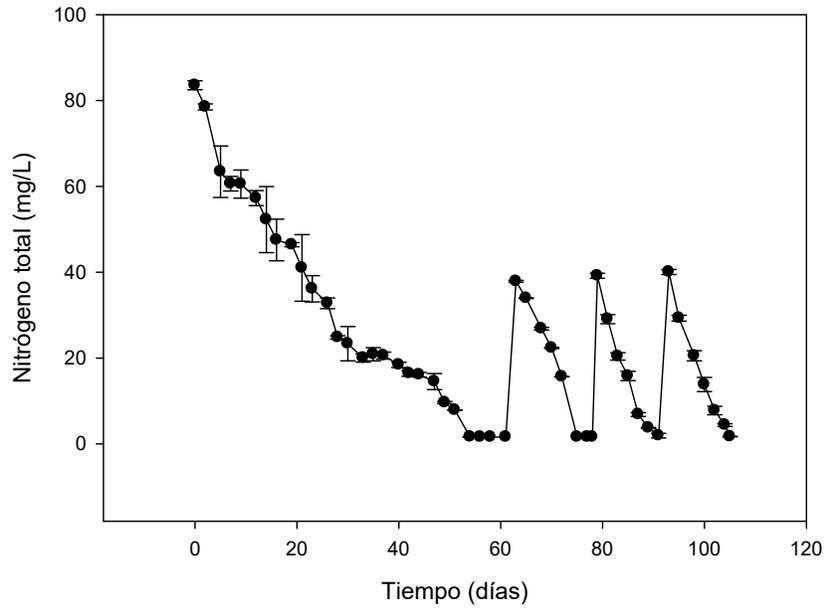


Figura 53. Concentración de nitrógeno total en el cultivo de *Tetraselmis* sp.

También se determinaron la concentración de ortofosfatos y de materia orgánica medida como DQO, cuya remoción se aprecia en las Figura 54 y Figura 55 respectivamente.

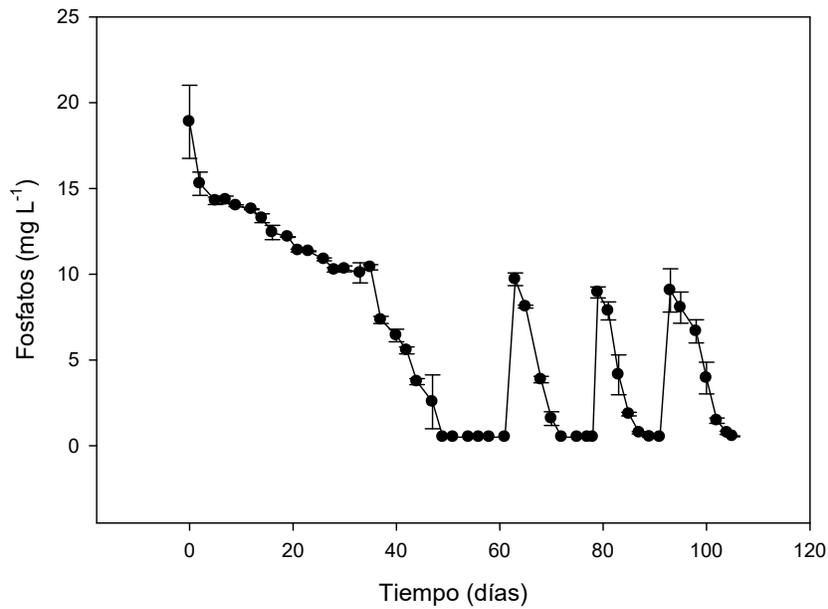


Figura 54. Concentración de ortofosfatos en el cultivo de *Tetraselmis* sp.

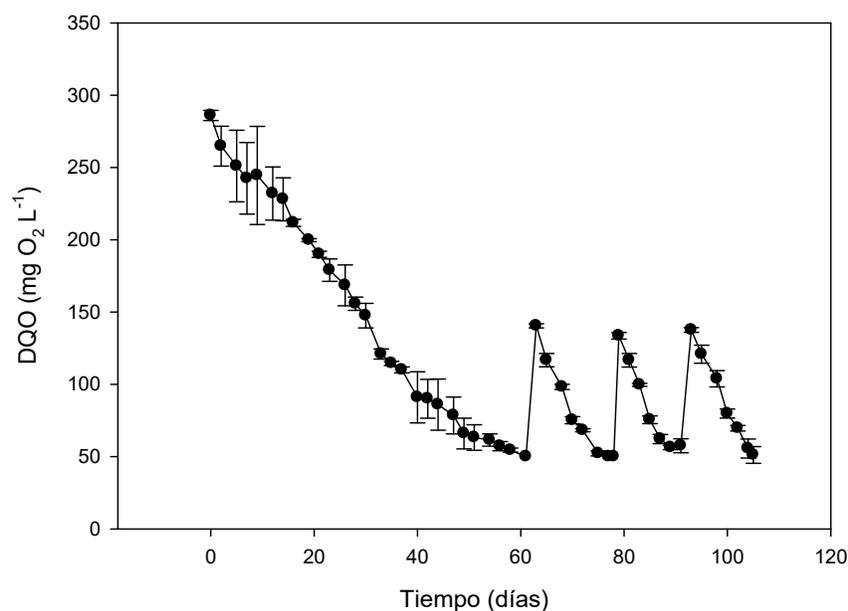


Figura 55. Concentración de materia orgánica medida como DQO en el cultivo de *Tetraselmis* sp.

De la Figura 51 se puede observar que la primera etapa de cultivo duró alrededor de 60 días, lo cual pudo deberse a que el inóculo inicial fue muy bajo y que la microalga estuvo en una fase de adaptación al cultivarla en un volumen mayor al que se había cultivado en la primera etapa experimental. Además la temperatura del cultivo fue menor que en la primera etapa experimental y al ser un reactor diferente también afectó la penetración de la luz en el medio de cultivo, afectando la velocidad de crecimiento de la microalga. Debido al largo tiempo de cultivo no se calcularon productividades de biomasa ni de lípidos ni cinéticas de remoción de nutrientes, las cuales seguramente serían muy bajas.

Se puede apreciar que en las gráficas de nitrógeno (Figura 53), ortofosfatos (Figura 54) y DQO (Figura 55), que hay un aumento de nutrientes en el día 63 de cultivo. En las gráficas de biomasa (Figura 51) y lípidos (Figura 52) pasa lo contrario, en el día 63 hay una reducción de la concentración tanto de biomasa como de lípidos. Esto se debe a que ese día se retiró la mitad del cultivo y se agregó agua residual sintética, ya que la concentración de lípidos comenzó a disminuir. La adición de agua residual sintética provocó un aumento en la concentración de nutrientes pero una reducción en la concentración de biomasa que ocasionó la reducción de los lípidos.

Del día 63 al 79 se tuvo otra etapa de crecimiento, apreciándose en la Figura 52 la concentración máxima de lípidos a los 77 días de cultivo (60.7 mg L^{-1}). Al día 79 se aprecia que los lípidos disminuyeron, por lo cual en este día se volvió a hacer un recambio de medio de cultivo. La siguiente etapa de crecimiento se tuvo de los días 80 al 92, teniendo el mayor contenido de lípidos a los 91 días de cultivo (75.2 mg L^{-1}), la última etapa de crecimiento se dio de los días 93 al 105, donde el mayor contenido de lípidos se obtuvo a los 105 días (77.6 mg L^{-1}).

Como ocurrió en la etapa de cultivo a nivel matraz, en este cultivo a mayor volumen se puede apreciar de los resultados en las gráficas que cuando la concentración de nutrientes en el medio de cultivo es baja (Figura 53 y Figura 54), comienza a aumentar la cantidad de lípidos en el mismo (Figura 52), por las condiciones de estrés a la que la microalga está sometida.

En la Tabla 25 se pueden ver las productividades de biomasa y lípidos, las tasas de crecimiento específico y las remociones y cinéticas de remoción de nitrógeno total, ortofosfatos y DQO.

Tabla 25. Productividades de biomasa y lípidos, tasas de crecimiento específico y remoción de nutrientes en los cultivos de *Tetraselmis* sp.

Etapa de crecimiento	Productividades (mg L ⁻¹ día ⁻¹)		Tasa de crecimiento específico (día ⁻¹)	Porcentaje de remoción			Cinéticas de remoción (mg L ⁻¹ día ⁻¹)		
	Biomasa	Lípidos		Nitrógeno total	Ortofosfatos	DQO	Nitrógeno total	Ortofosfatos	DQO
Segunda (días 63 a 79)	50.44	4.84	0.084	95.6 %	94.8 %	64.4 %	3.02	1.02	6.46
Tercera (días 80 a 92)	57.74	6.61	0.087	95.1 %	94.4 %	56.9 %	3.10	0.70	6.34
Cuarta (días 93 a 105)	64.1	5.27	0.067	95.7 %	93.9 %	62.8 %	3.19	0.71	7.20

La baja productividad de biomasa alcanzada en el cultivo a mayor volumen, en comparación con la alcanzada en los cultivos a escala laboratorio (124.5 mg L⁻¹ día⁻¹), se debió a que en un tiempo de cultivo similar al de los cultivos a escala laboratorio, solo se produjeron alrededor de 800 mg L⁻¹ de biomasa ya que se inició con cerca de 375 mg L⁻¹ de biomasa, mientras que a nivel matraz se produjeron cerca de 1000 mg L⁻¹ de biomasa, donde se inició con 227 mg L⁻¹ de biomasa y al final de los dos cultivos se obtuvo una concentración muy similar de biomasa, cercana a los 1200 mg L⁻¹ de biomasa.

En comparación con los cultivos a nivel laboratorio, donde se obtuvo una productividad de lípidos de 29.48 mg L⁻¹ día⁻¹, en los cultivos a mayor volumen, la productividad de lípidos fue cerca de la sexta parte de la de la primera etapa (un promedio de 5.57 mg L⁻¹ día⁻¹) debido a que se obtuvo una menor cantidad de lípidos en las microalgas en los cultivos a mayor volumen (en promedio 74.15 mg L⁻¹), que la que se obtuvo en los cultivos en matraces (109.1 mg L⁻¹). Esto pudo deberse a que no había tanta penetración de luz como en la primera etapa experimental y a que la temperatura del cultivo fue más baja, limitando el crecimiento de las microalgas.

La remoción de nitrógeno y ortofosfatos fue similar a la de los cultivos a nivel matraz (cerca al 95 %), sin embargo las cinéticas de remoción en esta etapa (un promedio de $3.11 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y $0.81 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, respectivamente) fueron menores que en el cultivo a nivel matraz ($7.35 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y $1.48 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, respectivamente), debido a que las concentraciones iniciales de nutrientes fueron la mitad de lo que se tenía a nivel matraz por la dilución que se produce al agregar agua residual sintética al medio que tiene una baja concentración de nutrientes. El porcentaje de remoción de DQO fue menor en esta etapa (61.4 % en promedio) que en la del cultivo a nivel matraz (80 %), nuevamente debido a que la concentración inicial es menor por la dilución. Sin embargo, en este caso las cinéticas de remoción fueron muy similares, $6.67 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para los cultivos en mayor volumen y $6.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para los cultivos a nivel matraz.

Con estos resultados se puede apreciar que al escalar los cultivos hay un menor control de las variables externas como son la penetración de la luz, además de haber una mayor variación de ciertos parámetros como el pH y a temperatura que afectan las condiciones de cultivo con lo que los resultados obtenidos no son los esperados.

Modelo conceptual de producción de lípidos bajo condiciones de estrés

En la Figura 56 se puede observar un modelo donde se ven algunas de las rutas metabólicas de las microalgas para la producción de sus componentes celulares. Los componentes nitrogenados son utilizados esencialmente para la síntesis de proteínas y de material genético. El carbono fijado por la fotosíntesis es utilizado para la síntesis de carbohidratos y de lípidos.

En la Figura 57 se observa un modelo conceptual de la producción de lípidos en condiciones de estrés por baja concentración de nitrógeno y por exceso de luz, que permita entender el mecanismo por el cual las microalgas utilizadas en este trabajo acumularon lípidos durante la fase estacionaria de crecimiento, donde había bajas concentraciones de nutrientes. Durante la limitación de nitrógeno, representada por la cruz roja sobre las especies nitrogenadas, se activan las rutas marcadas con las flechas rojas para la producción de lípidos. El nitrógeno se obtiene del reciclaje de proteínas, una de las más disponibles es la clorofila por lo que hay una reducción en la tasa fotosintética, reduciéndose por consiguiente la fijación de carbono a través de la fotosíntesis e inhibiéndose las rutas marcadas con las cruces rojas. Estas rutas son inhibidas debido a que ya no se requiere la síntesis de proteínas y de material genético porque la célula ya no está en etapa de división la encontrarse en la fase estacionaria de crecimiento. Debido a la reducción en la tasa fotosintética, hay una disminución en el contenido de carbono dentro de la célula el cual es obtenido a partir del reciclaje de lípidos de membranas y la degradación de proteínas. El carbono obtenido de la degradación de proteínas, carbohidratos y lípidos es utilizado para la síntesis de ácidos grasos que se almacenan como cuerpos lipídicos dentro de la célula. Cuando hay un exceso de luz se activan las rutas marcadas con las flechas amarillas para la producción de lípidos. Además de esto se activan las rutas de síntesis de carotenoides que son enviados a los cuerpos lipídicos los cuales tienen la función de protectores contra el estrés oxidativo causado por el exceso de radiación.

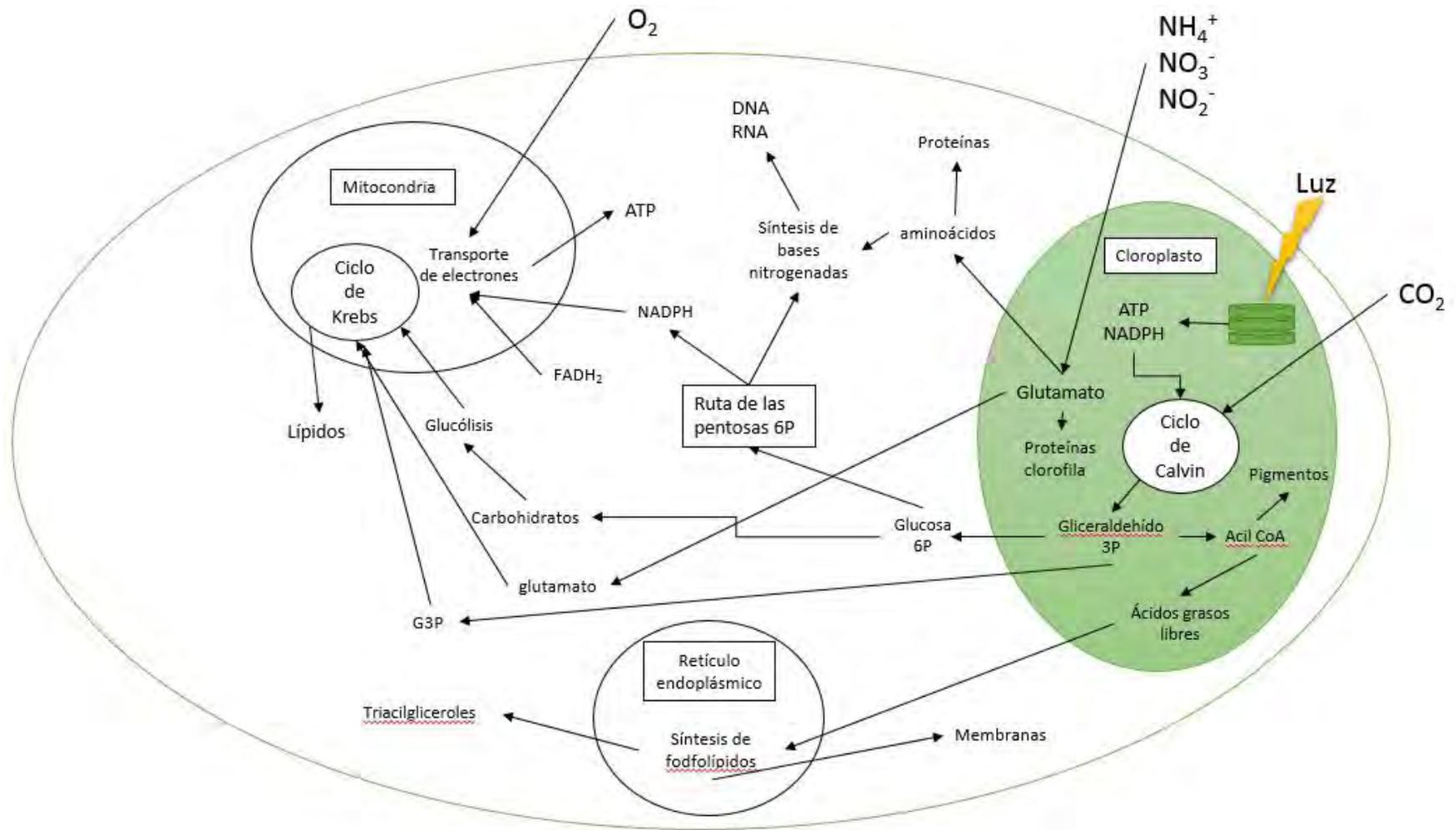


Figura 56. Modelo conceptual de producción de lípidos en las microalgas en condiciones de crecimiento sin estrés, adaptado de [108], [171], [172], [122], [173], [106], [174], [175], [176], [177], [178], [107] y [179].

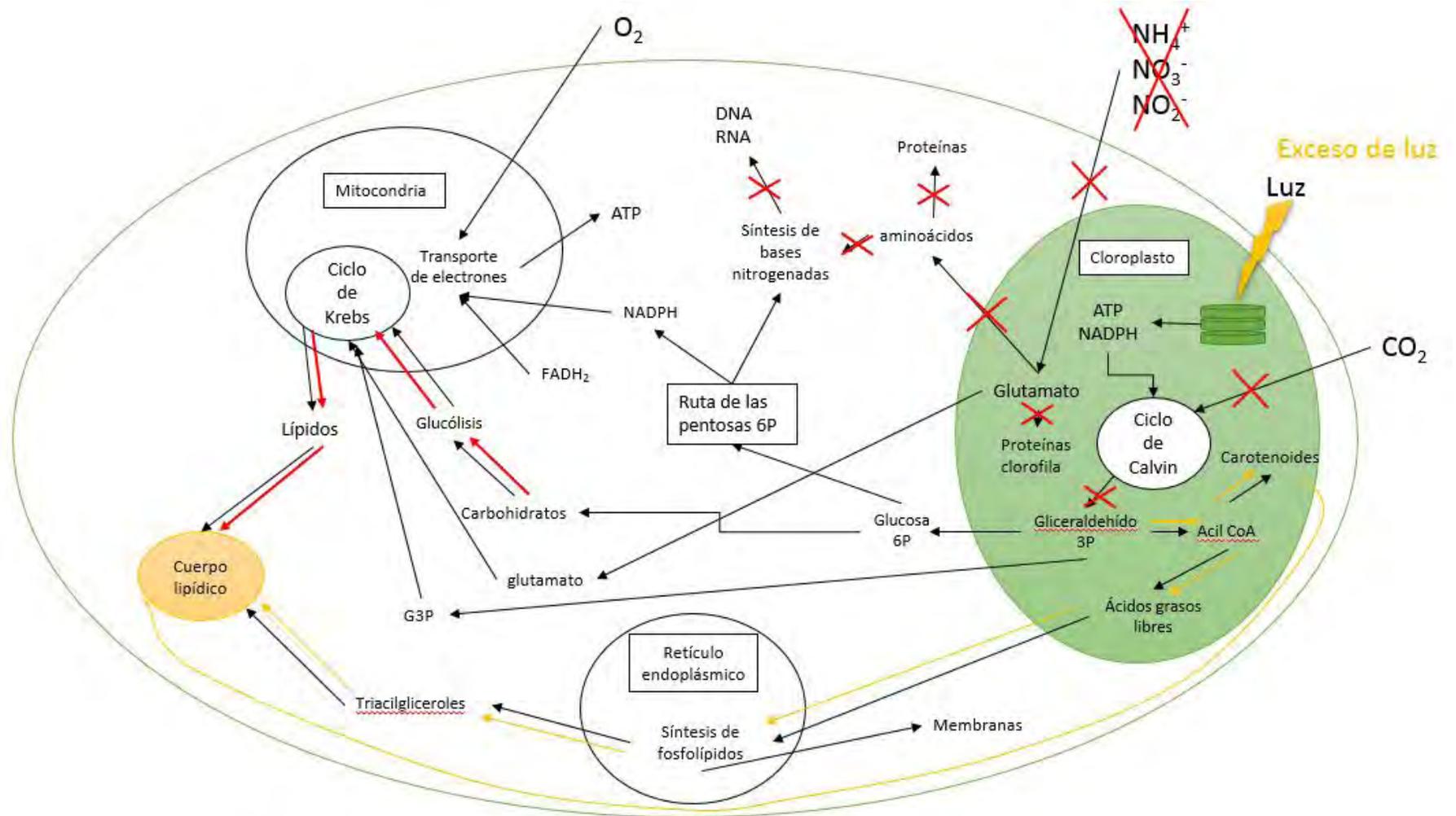


Figura 57. Modelo conceptual de producción de lípidos en las microalgas en condiciones de crecimiento con estrés por deficiencia de nitrógeno y exceso de luz, adaptado de [108], [171], [172], [122], [173], [106], [174], [175], [176], [177], [178], [107] y [179].

Modelo de crecimiento en cultivo semicontinuo

El modelo de crecimiento para *Tetraselmis* sp. en cultivo semicontinuo se hizo según el modelo descrito por Quinlan (1986), que es un modelo de crecimiento logístico para un cultivo semicontinuo que liga el crecimiento celular, expresado como concentración de biomasa, con la concentración extracelular del nutriente limitante, en este caso el nitrógeno total.

La ecuación del modelo es:

$$C_n = \frac{C_\infty}{1 + \left(\frac{C_\infty}{C_0} - 1\right) e^{-\mu\tau}}$$

Donde C_n es la concentración de biomasa en el tiempo n , C_0 es la concentración de biomasa al inicio del periodo de observación ($t=0$), C_∞ es la concentración de biomasa en el estado estacionario de crecimiento de la microalga, τ es el tiempo desde el inicio hasta el final del intervalo de crecimiento (si $t=1$ día, entonces $0 \leq \tau \leq 1$ día) y μ es la tasa aparente de crecimiento logístico para un cultivo semicontinuo (que puede definirse como $\mu = \Gamma N_T$, donde Γ es un coeficiente de la tasa de crecimiento y N_T es la concentración total del nutriente limitante, en este caso nitrógeno).

Debido a que no se puede obtener μ de los datos experimentales, se debe linealizar la ecuación para poder obtener los parámetros de μ y de C_∞ .

Al hacer lineal la ecuación del modelo se obtiene:

$$\ln \frac{C_\infty - C_n}{C_n} = \ln \frac{C_\infty - C_0}{C_0} - \mu\tau$$

Debido a que el término C_∞ aparece de los dos lados de la ecuación de la recta, se debe obtener un valor tentativo a partir de los datos experimentales para proceder a hacer una regresión lineal iterativa mediante la variación de este valor hasta obtener la máxima R^2 de la regresión lineal y usar la ecuación de la recta para obtener los valores tanto de μ como de C_∞ .

Se puede obtener un valor de C_∞ a partir de los datos experimentales mediante la ecuación:

$$C_\infty = Y_{C/N} N_T$$

Donde N_T es la concentración total del nutriente limitante (en este caso nitrógeno) en el medio de cultivo en el intervalo de crecimiento, $Y_{C/N}$ es un coeficiente de rendimiento que relaciona la cantidad de biomasa producida con relación a la cantidad del nutriente limitante consumido, que puede ser calculado mediante la ecuación:

$$Y_{C/N} = \frac{C_1 - C_0}{N_0 - N_1}$$

Donde C_1 es la concentración de biomasa después del primer intervalo de cultivo, N_0 es la concentración inicial de nitrógeno y N_1 es la concentración de nitrógeno después del primer intervalo de cultivo.

A partir de los promedios de los datos experimentales se obtiene $Y_{C/N}=0.014$ y $N_T = 0.085 \text{ g L}^{-1}$, obteniéndose un valor de $C_\infty = 1.31 \text{ g L}^{-1}$. Este es el primer valor que se mete en la ecuación y a partir de ahí se varía el valor de C_∞ hasta obtener el valor máximo de R^2 en la regresión lineal. Esto se hizo para las 3 etapas de crecimiento obtenidas en el cultivo semicontinuo obteniéndose 3 diferentes valores de C_∞ y de μ .

Para determinar cuál de los valores utilizar se obtuvo el error absoluto de a media (MAE, por sus siglas en inglés) para comparar los valores obtenidos con el modelo con los experimentales. En la última etapa de crecimiento del alga fue en la que se obtuvo el menor MAE para la comparación entre los datos experimentales y los del modelo por lo que se utilizaron los parámetros obtenidos en esta etapa de cultivo para realizar el modelo. Los datos obtenidos fueron: $C_\infty = 1.29 \text{ g L}^{-1}$ y $\mu = 0.2773 \text{ día}^{-1}$.

Una vez que se llega a la fase estacionaria de cultivo es cuando se quita la mitad del volumen del medio de cultivo y se adiciona medio de cultivo nuevo, por lo que la nueva concentración inicial se define como:

$$C_0 = (1 - f)C_n$$

Donde f es la fracción de la muestra, definida como:

$$f = \frac{v}{V}$$

Donde v es la fracción de volumen de la muestra y V es el volumen total de cultivo. En este caso se sacó la mitad del volumen del medio de cultivo por lo que $f=0.5$.

En la Figura 58 se presenta la gráfica del crecimiento de *Tetraselmis* sp. en un cultivo semicontinuo según el modelo de crecimiento logístico planteado anteriormente.

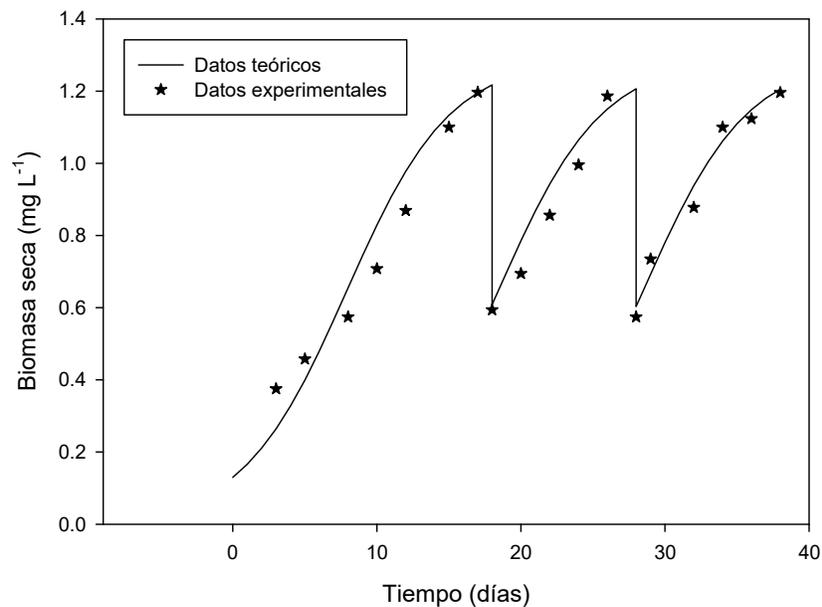


Figura 58. Crecimiento semicontinuo de *Tetraselmis* sp. según el modelo logístico propuesto

La Figura 58 muestra el crecimiento según el modelo planteado si se iniciara con el mismo inóculo con el que se inició en la etapa experimental, donde pasaron más de 60 días para llegar a la primera fase estacionaria, en el modelo solo pasan 18 días y los ciclos se repiten cada 10 días a diferencia de la etapa experimental donde pasaban 11 días aproximadamente entre cada ciclo. Además se puede observar el ajuste que tienen los datos experimentales con el modelo teórico al no haber una gran diferencia entre ambos valores.

Cosecha de la biomasa del medio de cultivo

Una vez que se retiraron los 35 L de cultivo se llevó a cabo un proceso de coagulación floculación con quitosano para separar la biomasa del medio de cultivo.

Para esto primero se realizaron pruebas de jarras variando las dosis de quitosano y el pH para obtener las condiciones en las cuales se obtuviera la mejor floculación de la microalga. Para esto se midió la absorbancia del sobrenadante a 680 nm para determinar la cantidad de biomasa removida.

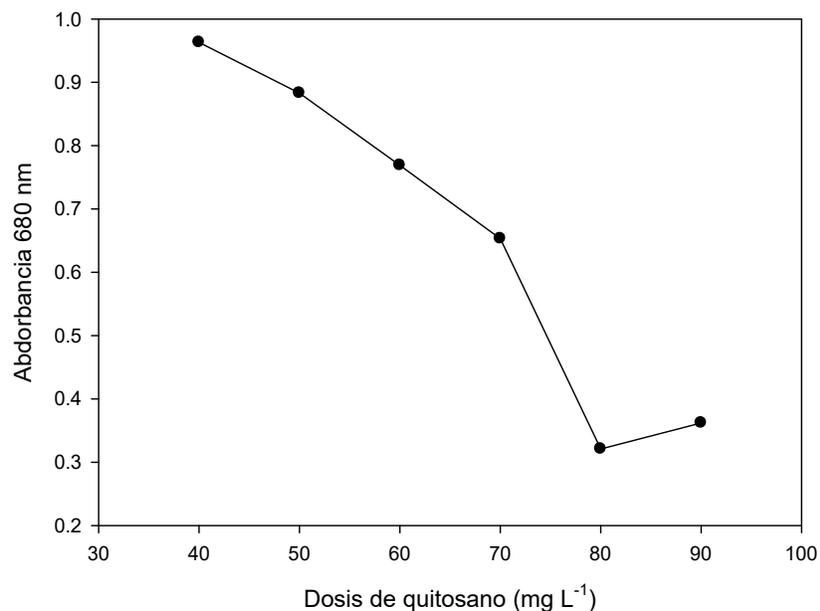


Figura 59. Remoción de biomasa en la prueba de jarras mediante variación de dosis de quitosano.

En la Figura 59 se puede observar que la dosis de quitosano a la cual se removió mayor cantidad de biomasa fue de 80 mg L⁻¹, ya que se obtuvo la menor absorbancia.

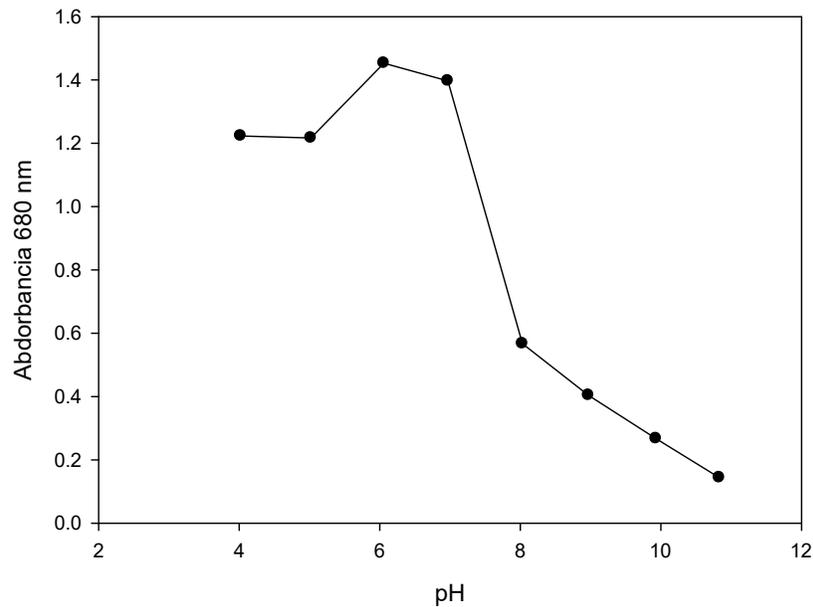


Figura 60. Remoción de biomasa en la prueba de jarras mediante variación de pH.

En la Figura 60 se puede observar que a un pH de 11 se alcanzó la mayor remoción de biomasa, debido a que se tuvo la menor absorbancia.

Las condiciones utilizadas para llevar a cabo la remoción de biomasa fueron agregando 80 mg L⁻¹ de quitosano y agregando KOH para elevar el pH del medio hasta un valor de 11.

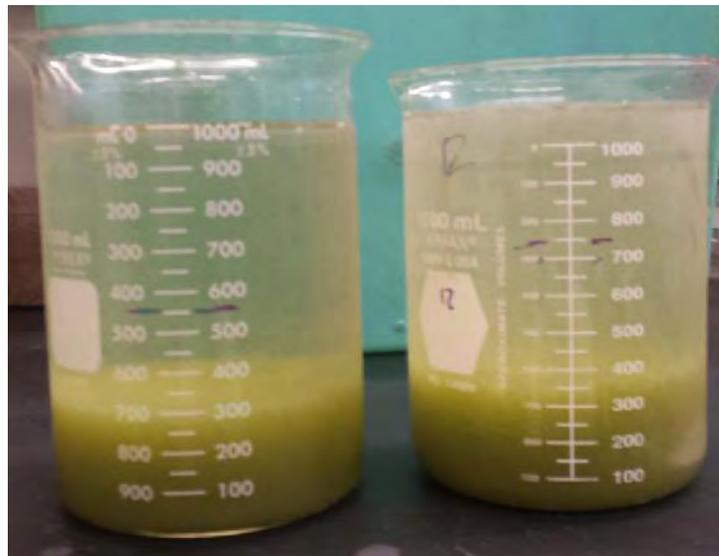


Figura 61. Coagulación floculación del cultivo de la microalga *Tetraselmis* sp.

En la Figura 61 se puede apreciar que gracias a la coagulación floculación con quitosano se pueden remover aproximadamente dos terceras partes del medio de cultivo. Lo que quedó de biomasa se centrifugó a 7000 rpm por 7 min para remover el exceso de medio de cultivo y posteriormente poder realizar la extracción de lípidos.

Determinación de lípidos en la biomasa de *Tetraselmis* sp.

Una vez que se removió la biomasa del medio de cultivo se extrajeron los lípidos de la biomasa obteniéndose una concentración de lípidos de 20.0 ± 2.6 %.

Este resultado es menor al obtenido por [181], para *T. suecica*, siendo de 25 a 30 %, la diferencia puede deberse a que en ese estudio los cultivos se realizaron en un fotobioreactor.

De cada uno de los picos de la Figura 51 se realizó la extracción de los lípidos, de la primera fase de cultivo se obtuvieron 5.29 g de lípidos, de la segunda fase de cultivo se obtuvieron 7.13 g de lípidos, de la tercera fase 8.64 g y de la última fase 9.56 g.

Producción de biodiesel y caracterización

Se realizó la transesterificación de los lípidos extraídos de la biomasa para producir el biodiesel. Se preparó el biodiesel para cada una de las etapas de crecimiento. De la primera fase de cultivo se obtuvieron 4.62 g de biodiesel, de la segunda fase de cultivo se obtuvieron 6.54 g de lípidos, de la tercera fase 7.80 g y de la última fase 8.89 g.

Una vez producido el biodiesel se realizó una mezcla de las cuatro muestras obtenidas, a la cual se le midió densidad, acidez e índice de yodo. Se obtuvo un valor de densidad de 0.870 ± 0.007 g mL⁻¹. Tanto en la norma ASTM D6751-12 [182] como en la EN 14214 [183] se menciona que la densidad del biodiesel debe estar entre 0.86 y 0.90 g mL⁻¹ a 15 °C. El biodiesel obtenido cumple con ambas normas. Se midió la acidez por triplicado, la cual fue de 0.71 ± 0.03 mg KOH g⁻¹. En la norma ASTM D6751-12 [182] la acidez del biodiesel debe ser de máximo 0.80 mg KOH g⁻¹ y en la EN 14214 [183] un máximo de 0.5 mg KOH g⁻¹, por lo que el biodiesel obtenido cumple únicamente con la norma estadounidense. El índice de yodo del biodiesel también se midió por triplicado y se obtuvo un valor de 103.7 ± 1.3 g yodo (100 g)⁻¹. En la norma EN 14214 [183] el límite máximo del índice de yodo es 120 g de yodo (100 g)⁻¹ para el biodiesel, por lo que el biodiesel obtenido cumple con esta norma.

Se realizó el perfil de ácidos grasos del biodiesel mediante cromatografía de gases para cada una de las fases de crecimiento, los resultados se presentan a continuación:

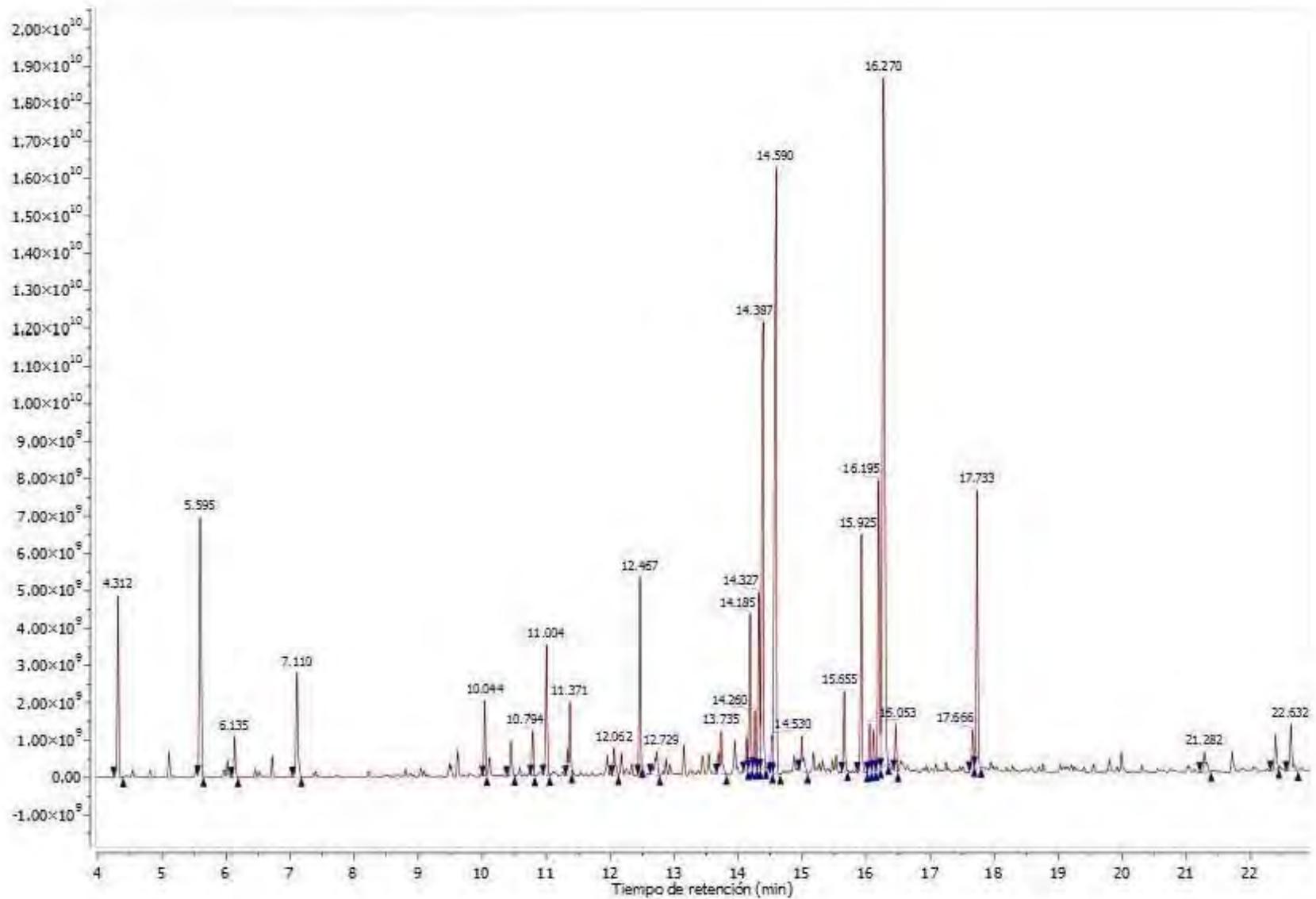


Figura 62. Cromatograma de los lípidos extraídos de la primera fase de crecimiento de *Tetraselmis* sp.

Tabla 26. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 62.

Tiempo de retención	Metil éster del ácido
12.4637	tridecanoico
14.3220	hexadecanoico
14.3797	Z-9-octadecanoico
14.5868	hexadecanoico
16.2725	Z-9-octadecanoico

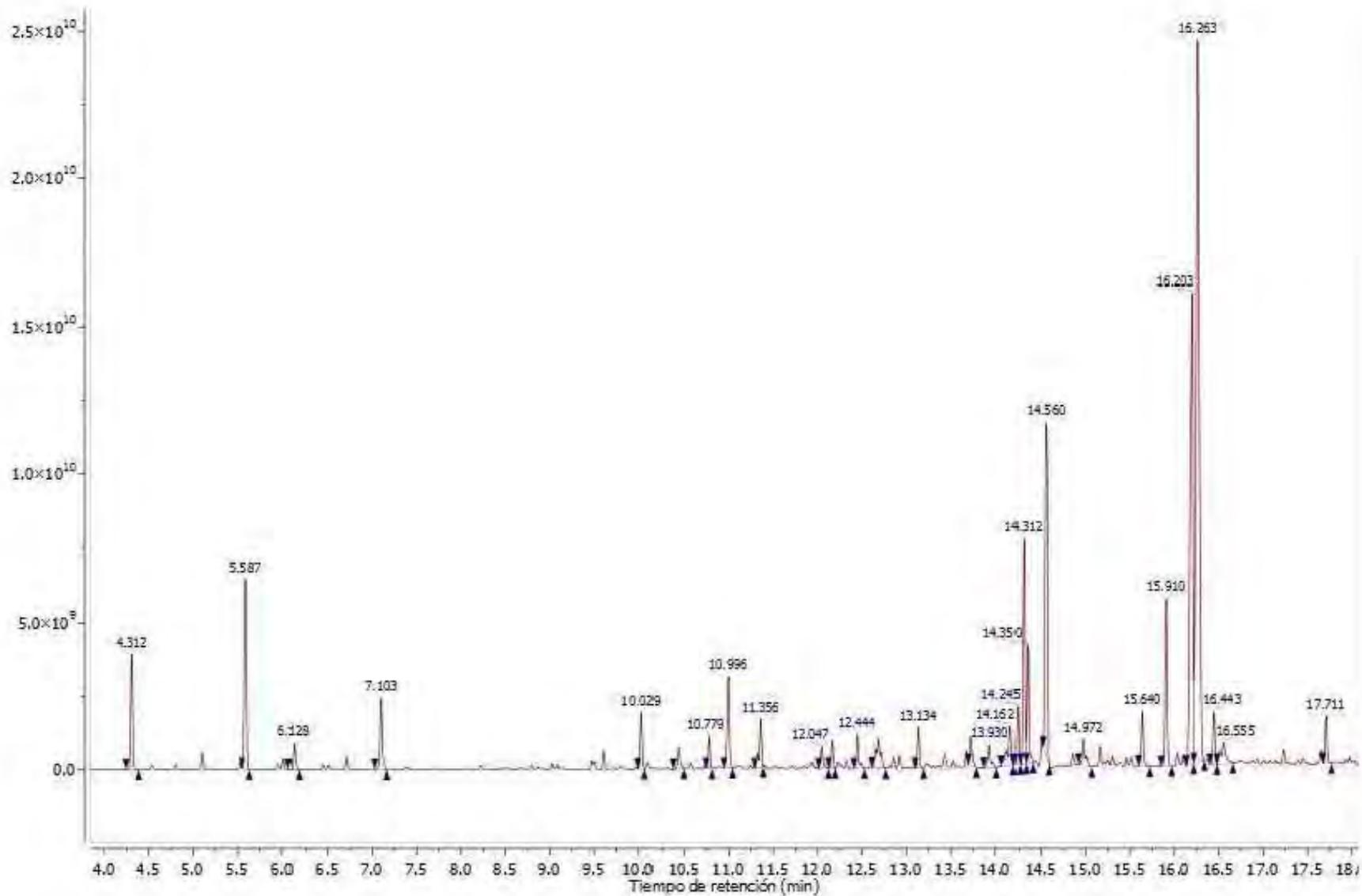


Figura 63. Cromatograma de los lípidos extraídos de la segunda fase de crecimiento de *Tetraselmis* sp.

Tabla 27. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 63.

Tiempo de retención	Metil éster del ácido
14.3062	Z-9-octadecanoico
14.3505	Z-9-octadecanoico
14.5531	hexadecanoico
15.1607	heptadecanoico
16.2598	Z-9-octadecanoico
16.2890	Z-9-octadecanoico

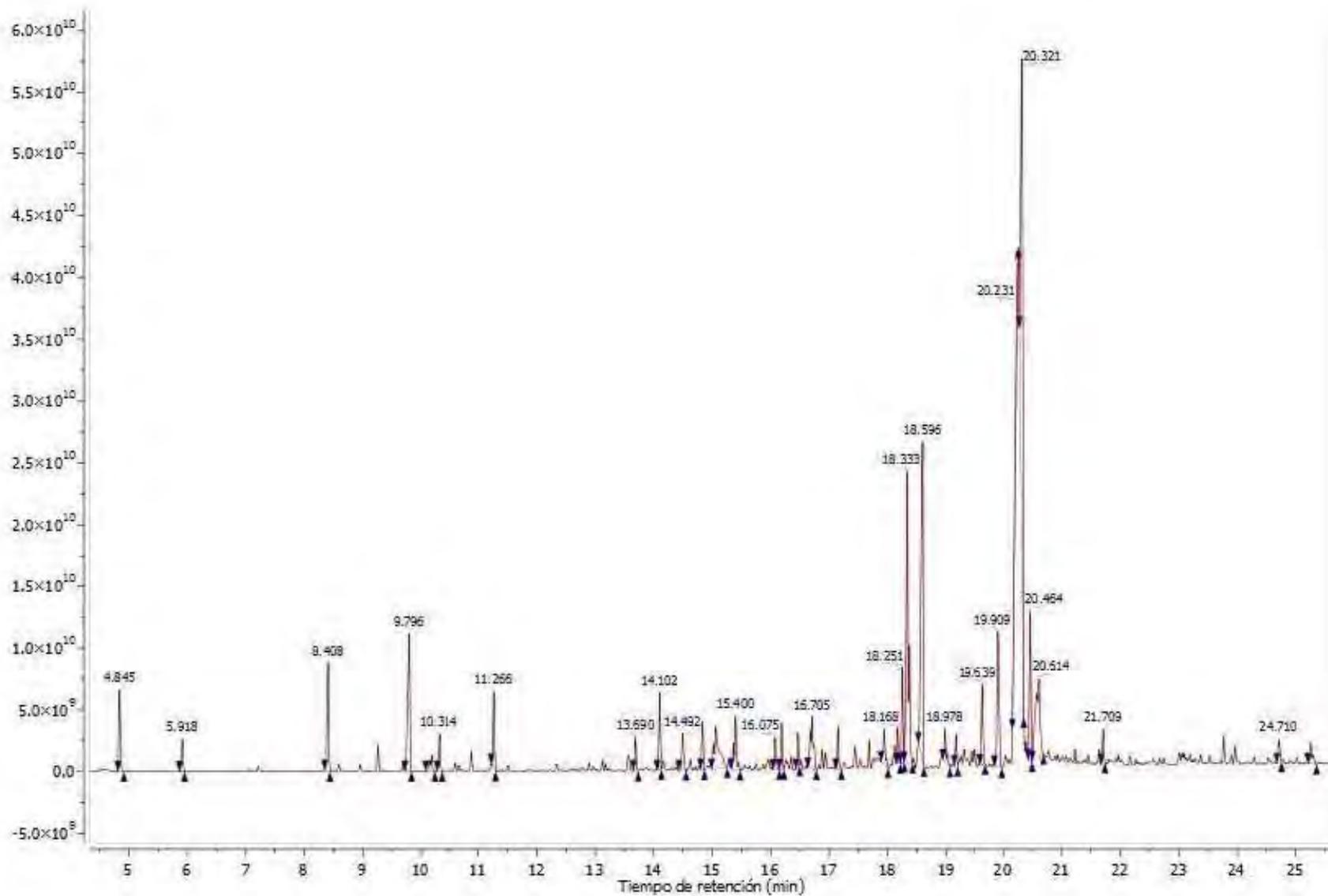


Figura 64. Cromatograma de los lípidos extraídos de la tercera fase de crecimiento de *Tetraselmis* sp.

Tabla 28. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 64.

Tiempo de retención	Metil éster del ácido
18.1914	hexadecanoico
18.3303	Z-9-octadecanoico
18.3641	Z-9-octadecanoico
18.5914	hexadecanoico
20.2929	Z-9-octadecanoico
20.3116	Z-9-octadecanoico
20.3191	Z-9-octadecanoico
20.4586	esteárico
20.4624	esteárico

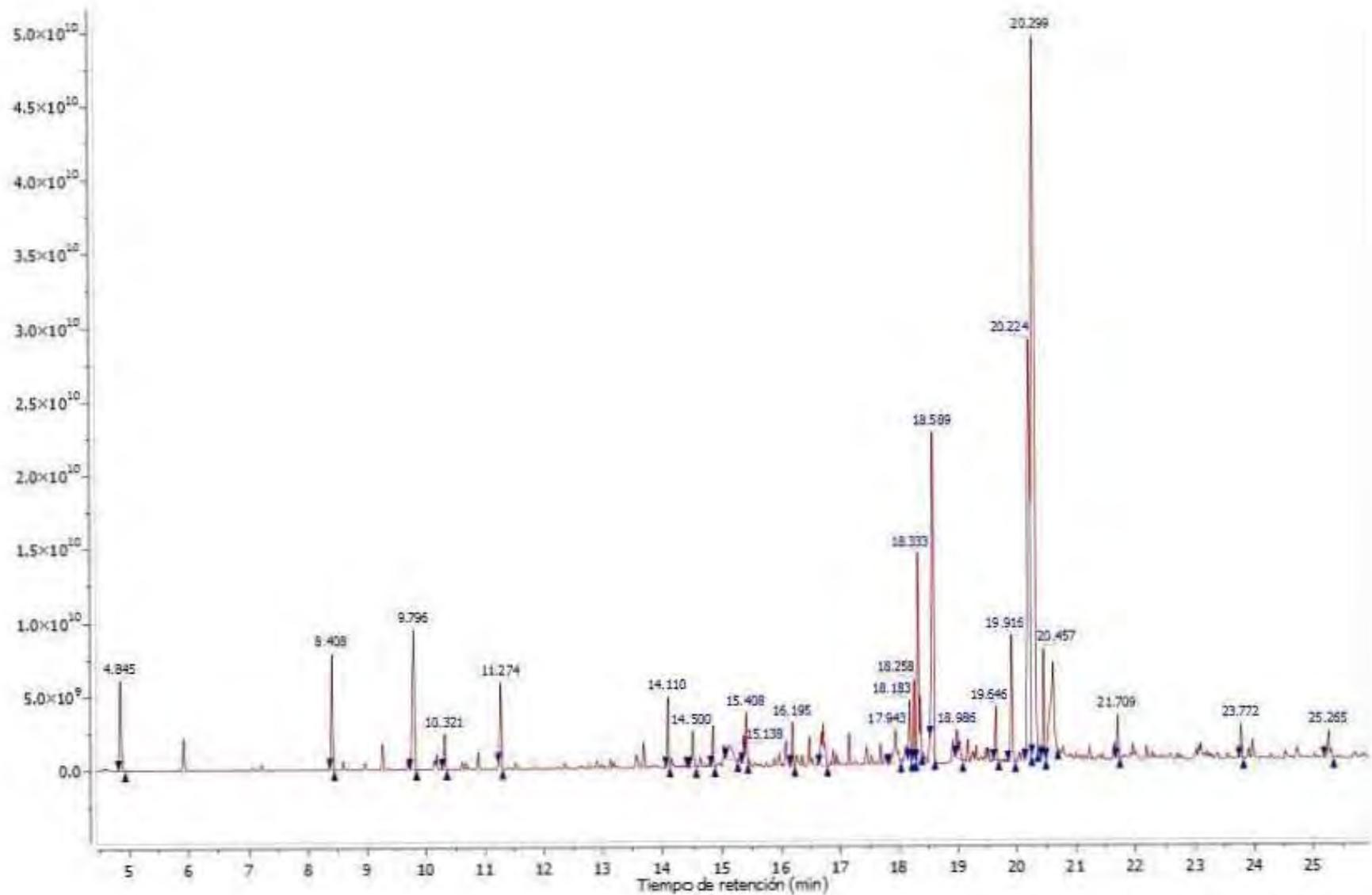


Figura 65. Cromatograma de los lípidos extraídos de la cuarta fase de crecimiento de *Tetraselmis* sp.

Tabla 29. Picos obtenidos del cromatograma de la Figura 65.

Tiempo de retención	Metil éster del ácido
18.3275	Z-9-octadecanoico
18.3650	Z-9-octadecanoico
18.5870	hexadecanoico
20.2982	Z-9-octadecanoico
20.3215	Z-9-octadecanoico
20.4520	esteárico
20.4558	esteárico

En la Tabla 26, Tabla 27, Tabla 28 y Tabla 29 se presentan únicamente los picos que correspondían a algún ácido graso en la muestra. De la Tabla 26, Tabla 27, Tabla 28 y Tabla 29 se puede observar que en todas fases de crecimiento se produjeron los ácidos grasos hexadecanoico y Z-9-octadecanoico. En el caso de la primera fase de crecimiento se produjo, además de los ácidos grasos antes mencionados, el ácido tridecanoico. En la segunda fase de crecimiento se produjo el ácido heptadecanoico además de los primeros dos mencionados. El perfil de ácidos grasos de la tercera y cuarta etapas de crecimiento fue muy similar, donde se produjo además de los primeros dos ácidos grasos mencionados, el ácido esteárico.

Determinación de carbohidratos en la biomasa de *Tetraselmis* sp.

Una vez que se extrajeron los lípidos de la biomasa de *Tetraselmis* sp. se realizó la determinación de carbohidratos en la biomasa residual obteniéndose un resultado de 13.3 ± 0.4 % en la biomasa seca de la microalga.

El contenido de carbohidratos obtenido es alto al compararlo con el estudio realizado por [184], donde se obtuvo un contenido de carbohidratos de 6.5 % después de 14 días de cultivo de *T. suecica* en agua residual municipal. Sin embargo en el estudio realizado por [185] donde cultivaron *Tetraselmis* sp. en agua residual urbana, obtuvieron un contenido de carbohidratos de 57.2 % después de 20 días de cultivo continuo, muy superior al contenido de carbohidratos obtenido en este estudio. El menor contenido de carbohidratos puede deberse a que en este estudio se dejó que la microalga se mantuviera durante la fase estacionaria de cultivo con bajas concentraciones de nutrientes, por lo cual según se puede observar en la Figura 57 los carbohidratos que se acumulan durante los primeros días de la fase estacionaria se van transformando en lípidos, disminuyendo el contenido de carbohidratos en la célula.

A partir del contenido de carbohidratos se puede hacer un cálculo teórico de la cantidad de bioetanol que podría obtenerse a partir de la biomasa de la microalga mediante la ecuación planteada en [186]:

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimiento de etanol} \left(\frac{\text{mL}_{\text{etanol}}}{\text{L}_{\text{cultivo}}} \right) &= [(\% \text{ carbohidratos en biomasa seca}) \\
 & * (\text{contenido de biomasa seca (gL}^{-1}\text{)}) \\
 & * (0.51 \text{ (factor de conversión de carbohidratos a etanol)}) \\
 & * (0.85 \text{ (eficiencia de conversión de carbohidratos a etanol)}) \\
 & / 0.789 \text{ (densidad del etanol (gmL}^{-1}\text{)})]
 \end{aligned}$$

El rendimiento de etanol a partir de la biomasa de *Tetraselmis* sp. sería de 8.8 mL L^{-1} .

Este rendimiento es superior al que se obtuvo en el estudio realizado por [184], donde el rendimiento de etanol para *T. suecica* sería de 1.7 mL L^{-1} , sin embargo es bastante menor al obtenido en el estudio realizado por [185] donde se obtendrían 43.9 mL L^{-1} .

Conclusiones

De los resultados obtenidos para el cultivo de las 3 especies de microalgas se puede observar que al mantener los cultivos durante la fase estacionaria de cultivo (5 días para *Tetraselmis* sp., 6 días para *Dunaliella* sp. y 10 días para *Nannochloropsis* sp.) se da un aumento en el contenido de lípidos de las mismas, debido a al estrés al que se someten por la baja concentración de nutrientes, sin haber una pérdida significativa del contenido de biomasa en el medio de cultivo.

La concentración de nitrógeno en el medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre el contenido de lípidos en las microalgas, ya que al haber una baja concentración de este nutriente las especies de microalgas, evaluadas en este trabajo, se estresan y acumulan lípidos como energía de reserva en respuesta al estrés. La concentración de nitrógeno tiene un efecto sobre la productividad de biomasa en la fase logarítmica de crecimiento al ser un nutriente esencial para el crecimiento de las microalgas, pero ya no hay un efecto de este nutriente en la fase estacionaria al no existir una reducción en la concentración de biomasa.

En el caso de los cultivos de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp., la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos no tiene efecto sobre la acumulación de lípidos, al contrario de lo que sucede en los cultivos de *Nannochloropsis* sp. La DFFFA tiene un efecto sobre la productividad de biomasa ya que se obtuvieron diferentes productividades de biomasa para diferentes DFFFA.

Al utilizar un diferente tipo de reactor (laguna de oxidación de alta tasa) y aumentar los volúmenes de cultivo de la microalga *Tetraselmis* sp. se obtuvo un efecto negativo tanto en las productividades de biomasa como de lípidos. El efecto del cultivo semicontinuo, a una menor temperatura, también tuvo un efecto negativo sobre el contenido de biomasa y lípidos.

El biodiesel obtenido cumple con los parámetros de la norma ASTM D6751-12 en cuanto a densidad y acidez, en el caso de la norma EN 14214 cumple con los parámetros de densidad e índice de yodo pero no para el de acidez.

Según el modelo conceptual las bajas concentraciones de nitrógeno producen estrés en las microalgas, evaluadas en este trabajo, modificando las rutas metabólicas para acumular lípidos como energía de reserva. Esto mismo pasa con altas densidades de flujo de fotones fotosintéticamente activos hasta el punto donde comienza la fotoinhibición.

Los resultados obtenidos señalan que las microalgas evaluadas en este trabajo tienen potencial para ser utilizadas para llevar a cabo el tratamiento de aguas residuales de efluentes de la maricultura, obteniéndose biomasa que puede ser utilizada para la producción de productos de valor agregado como son el biodiesel y el bioetanol con lo cual se pueden reducir los costos de tratamiento del agua residual. Se recomienda realizar trabajos subsecuentes para lograr escalar los cultivos de *Tetraselmis* sp y obtener altas productividades de biomasa y de lípidos.

Referencias

- [1] N.M. Nasir, N.S.A. Bakar, F. Lananan, S.H. Abdul Hamid, S.S. Lam, A. Jusoh, Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting, *Bioresour. Technol.* 190 (2015) 492–498. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.023.
- [2] B. Samuel-Fitwi, S. Wuertz, J.P. Schroeder, C. Schulz, Sustainability assessment tools to support aquaculture development, *J. Clean. Prod.* 32 (2012) 183–192. doi:10.1016/j.jclepro.2012.03.037.
- [3] J. Zheng, J.M. Hao, B. Wang, C. Shui, Bioremediation of Aquaculture Wastewater by Microalgae *Isochrysis zhanjiangensis* and Production of the Biomass Material, *Key Eng. Mater.* 460–461 (2011) 491–495. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.460-461.491.
- [4] J. Ahmad, L. Faturrahman, A.H.S. Hajar, Batch Phytoremediation of Aquaculture Wastewater of Silver Barramundi (*Lates calcarifer*) Utilizing Green Microalgae; *Chlorella* sp., *J. Fish. Aquat. Sci.* 8 (2013) 516–525.
- [5] H. Chan, Recycling of Nutrients from Trash Fish Wastewater for Microalgae Production as Health and Pharmaceutical Products and Renewable Energy, *WebmedCentral Microbiol.* 2 (2011) 1–19.
- [6] B. Dong, N. Ho, K.L. Ogden, R.G. Arnold, Cultivation of *Nannochloropsis salina* in municipal wastewater or digester centrate., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103 (2014) 45–53. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.02.001.
- [7] A.E.M. Abdelaziz, G.B. Leite, P.C. Hallenbeck, Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1807–1836. doi:10.1080/09593330.2013.831487.
- [8] G. Breuer, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*., *Bioresour. Technol.* 143 (2013) 1–9. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.105.
- [9] P. Edwards, H. Demaine, Rural Aquaculture: Overview and framework for country reviews, Food and Agriculture Organization (FAO), Bangkok, 1997.
- [10] S.S. De Silva, Aquaculture: a newly emergent food production sector — and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation, *Biodivers. Conserv.* 21 (2012) 3187–3220. doi:10.1007/s10531-012-0360-9.
- [11] M. Ottinger, K. Clauss, C. Kuenzer, Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review, *Ocean Coast. Manag.* 119 (2016) 244–266. doi:10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015.
- [12] C. Sosa-Villalobos, M.R. Castañeda-Chávez, I.A. Amaro-Espejo, I. Galaviz-Villa, F. Lango-Reynoso, Review Diagnosis of the current state of aquaculture production systems with regard to the environment in Mexico, *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44 (2016) 193–201. doi:10.3856/vol44-issue2-fulltext-1.
- [13] M. Ovando Solís, La acuicultura y sus efectos en el medio ambiente, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 2015.
- [14] H.A. González Ocampo, Efectos ambientales producidos por la camaronicultura en el norte de Sinaloa, México, *Ra Ximhai.* 6 (2010) 9–16.
- [15] A. Plascencia Espinosa, M. del C. Bermúdez Almada, La acuicultura y su impacto al medio ambiente, *Estud. Soc. ISSN.* 2 (2012) 221–232.

- [16] J. Isaac Flores, E. Martínez González, P. Dávila Prado, Puntos críticos en la evaluación de impacto ambiental de la camaronicultura en el Pacífico de Nicaragua, durante su proceso productivo: producción de larvas, operación y abandono de granjas, *Universitas (Stuttg)*. 1 (2007) 33–38.
- [17] E. Peña Messina, El cultivo de camarón y la calidad ambiental: ¿Cómo disminuir sus efectos nocivos en las costas de Nayarit?, *Rev. Fuente*. 1 (2009) 13–17.
- [18] A. Bouwman, A. Beusen, C. Overbeek, D. Bureau, M. Pawlowski, P. Glibert, Hindcasts and Future Projections of Global Inland and Coastal Nitrogen and Phosphorus Loads Due to Finfish Aquaculture Hindcasts and Future Projections of Global Inland and Coastal Nitrogen and Phosphorus Loads Due to Finfish Aquaculture, *Rev. Fish. Sci.* 21 (2013) 112–156. doi:10.1080/10641262.2013.790340.
- [19] C.E. Boyd, Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level, *Aquaculture*. 226 (2003) 101–112. doi:10.1016/S0044-8486(03)00471-X.
- [20] R. Crab, Y. Avnimelech, T. Defoirdt, P. Bossier, W. Verstraete, Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production, *Aquaculture*. 270 (2007) 1–14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.006.
- [21] J. van Rijn, Waste treatment in recirculating aquaculture systems, *Aquac. Eng.* 53 (2013) 49–56. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.010.
- [22] D. Klinger, R. Naylor, Searching for solutions in aquaculture: charting a sustainable course, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 37 (2012) 247–276. doi:10.1146/annurev-environ-021111-161531.
- [23] C.J. Ramírez Valdez, Evaluación de la gestión ambiental sobre la actividad acuícola en el municipio de Guasave, Sinaloa, El Colegio de la Frontera Norte, 2010.
- [24] S.A. Castine, A.D. McKinnon, N.A. Paul, L.A. Trott, R. de Nys, Wastewater treatment for land-based Aquaculture: Improvements and value-adding alternatives in model systems from Australia, *Aquac. Environ. Interact.* 4 (2013) 285–300. doi:10.3354/aei00088.
- [25] C.E. Boyd, D. Gautier, Effluent composition and water quality standards, *Glob. Aquac. Advocate*. 3 (2000) 61–66.
- [26] L. Bouwman, A. Beusen, P.M. Glibert, C. Overbeek, M. Pawlowski, J. Herrera, S. Muslow, R. Yu, M. Zhou, Mariculture: significant and expanding cause of coastal nutrient enrichment, *Environ. Res. Lett.* 8 (2013) 1–5. doi:10.1088/1748-9326/8/4/044026.
- [27] J.-K. Wang, Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system, *Aquac. Eng.* 28 (2003) 37–46. doi:10.1016/S0144-8609(03)00020-7.
- [28] R. Boopathy, Biological treatment of shrimp production wastewater, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 989–992. doi:10.1007/s10295-009-0577-0.
- [29] N. Abdel-Raouf, A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem, Microalgae and wastewater treatment., *Saudi J. Biol. Sci.* 19 (2012) 257–75. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005.
- [30] A.E. Ghaly, M. Kamal, N.S. Mahmoud, Phytoremediation of aquaculture wastewater for water recycling and production of fish feed, *Environ. Int.* 31 (2005) 1–13. doi:10.1016/j.envint.2004.05.011.
- [31] M. Borges, A. Morais, P. Castro, Performance of outdoor seawater treatment systems for recirculation in an intensive turbot (*Scophthalmus maximus*) farm, *Aquac. Int.* 11 (2003) 557–570.
- [32] E. Metaxa, G. Deviller, P. Pagand, C. Alliaume, C. Casellas, J.P. Blancheton, High

- rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: Water purification and fish health, *Aquaculture*. 252 (2006) 92–101. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.053.
- [33] M. Badiola, D. Mendiola, J. Bostock, Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges, *Aquac. Eng.* 51 (2012) 26–35. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.07.004.
- [34] U. Yogev, K.R. Sowers, N. Mozes, A. Gross, Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system, *Aquaculture*. 467 (2017) 118–126. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.04.029.
- [35] M.T. Borges, P. Silva, L. Moreira, R. Soares, Integration of consumer-targeted microalgal production with marine fish effluent biofiltration – a strategy for mariculture sustainability, *J. Appl. Phycol.* 17 (2005) 187–197. doi:10.1007/s10811-005-4842-y.
- [36] W. Guerhazi, S. Masmoudi, S. Boukhris, H. Ayadi, A. Morant-Manceau, Under low irradiation, the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae, *J. Appl. Phycol.* (2014). doi:10.1007/s10811-014-0260-3.
- [37] C. Magnotti, R. Lopes, R. Derner, L. Vinatea, Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production, *Aquac. Res.* (2015) 1–9. doi:10.1111/are.12691.
- [38] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 126–131. doi:10.1016/j.tibtech.2007.12.002.
- [39] Z. Arbib, J. Ruiz, P. Álvarez-Díaz, C. Garrido-Pérez, J. Barragan, J. a. Perales, Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater, *Ecol. Eng.* 52 (2013) 143–153. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.12.089.
- [40] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, *Appl. Energy*. 103 (2013) 444–467. doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.004.
- [41] J.N. Rogers, J.N. Rosenberg, B.J. Guzman, V.H. Oh, L.E. Mimbela, A. Ghassemi, M.J. Betenbaugh, G. a. Oyler, M.D. Donohue, A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales, *Algal Res.* 4 (2014) 76–88. doi:10.1016/j.algal.2013.11.007.
- [42] M.H.A. Michels, J. Camacho-Rodríguez, M.H. Vermuë, R.H. Wijffels, Effect of cooling in the night on the productivity and biochemical composition of *Tetraselmis suecica*, *Algal Res.* 6 (2014) 145–151. doi:10.1016/j.algal.2014.11.002.
- [43] T. Halfhide, A. Åkerstrøm, O.I. Lekang, H.R. Gislerød, S.J. Ergas, Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions, *Algal Res.* 6 (2014) 152–159. doi:10.1016/j.algal.2014.10.009.
- [44] S.A. Heidari, O. Farhadian, N. Soofiani, Biomass Production and Ammonia and Nitrite Removal from Fish Farm Effluent by *Scenedesmus Quadricauda* Culture, *J. Environ. Stud.* 37 (2011) 7–9.
- [45] W.-W. Li, H.-Q. Yu, Z. He, Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 911–924. doi:10.1039/c3ee43106a.
- [46] J.P. Sheets, X. Ge, S.Y. Park, Y. Li, Effect of outdoor conditions on *Nannochloropsis salina* cultivation in artificial seawater using nutrients from

- anaerobic digestion effluent., *Bioresour. Technol.* 152 (2014) 154–161. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.115.
- [47] C.I.M. Martins, E.H. Eding, M.C.J. Verdegem, L.T.N. Heinsbroek, O. Schneider, J.P. Blancheton, E.R. D’Orbcastel, J.A.J. Verreth, New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability, *Aquac. Eng.* 43 (2010) 83–93. doi:10.1016/j.aquaeng.2010.09.002.
- [48] M.T. Ale, M. Pinelo, A.S. Meyer, Assessing effects and interactions among key variables affecting the growth of mixotrophic microalgae: pH, inoculum volume, and growth medium composition., *Prep. Biochem. Biotechnol.* 44 (2014) 242–56. doi:10.1080/10826068.2013.812562.
- [49] H.M. Amaro, A.C. Guedes, F.X. Malcata, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Appl. Energy.* 88 (2011) 3402–3410. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014.
- [50] S. Ho, X. Ye, T. Hasunuma, J. Chang, A. Kondo, Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 1448–1459. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.09.002.
- [51] L. Zhu, Z. Wang, Q. Shu, J. Takala, E. Hiltunen, P. Feng, Z. Yuan, Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment, *Water Res.* 47 (2013) 4294–4302. doi:10.1016/j.watres.2013.05.004.
- [52] T. Cai, X. Ge, S.Y. Park, Y. Li, Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent., *Bioresour. Technol.* 144 (2013) 255–60. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.101.
- [53] J. Wang, H. Yang, F. Wang, Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 3307–3329. doi:10.1007/s12010-014-0729-1.
- [54] M.T. Arias Peñaranda, A. de J. Martínez Roldán, R.O. Cañizares Villanueva, Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos, *Acta Biológica Colomb.* 18 (2013) 43–68.
- [55] Y.-H. Wu, Y. Yu, H.-Y. Hu, Effects of initial phosphorus concentration and light intensity on biomass yield per phosphorus and lipid accumulation of *Scenedesmus* sp. LX1, *BioEnergy Res.* 7 (2014) 927–934. doi:10.1007/s12155-014-9411-2.
- [56] G. Venkata Subhash, M. Rohit, M.P. Devi, Y. Swamy, S. Venkata Mohan, Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater, *Bioresour. Technol.* 169 (2014) 789–793. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.019.
- [57] Q. Liu, T. Pang, L. Li, J. Liu, W. Lin, *Isochrysis* sp. IOAC724S, a newly isolated, lipid-enriched, marine microalga for lipid production, and optimized cultivation conditions, *Biomass and Bioenergy.* 60 (2014) 32–40. doi:10.1016/j.biombioe.2013.11.003.
- [58] M.R. Tredici, Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution, *Biofuels.* 1 (2010) 143–162. doi:10.4155/bfs.09.10.
- [59] Z. Guo, Y. Liu, H. Guo, S. Yan, J. Mu, Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production, *J. Environ. Sci.* 25 (2013) S85–S88. doi:10.1016/S1001-0742(14)60632-X.
- [60] Y. Zhang, X. Liu, M.A. White, L.M. Colosi, Economic evaluation of algae biodiesel

- based on meta-analyses, *Int. J. Sustain. Energy.* 36 (2017) 682–694. doi:10.1080/14786451.2015.1086766.
- [61] T. Cai, S.Y. Park, R. Racharaks, Y. Li, Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production, *Appl. Energy.* 108 (2013) 486–492. doi:10.1016/j.apenergy.2013.03.056.
- [62] T. Takeshita, S. Ota, T. Yamazaki, A. Hirata, V. Zachleder, S. Kawano, Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions., *Bioresour. Technol.* 158 (2014) 127–134. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.135.
- [63] M.T. Orta Ledesma de Velásquez, I. Monje-Ramírez, S. Velasquez-Orta, V. Rodriguez-Muñiz, I. Yáñez-Noguez, Ozone for Microalgae Biomass Harvesting from Wastewater, *Ozone Sci. Eng.* 39 (2017) 264–272. doi:10.1080/01919512.2017.1322488.
- [64] OLDEPESCA, La acuicultura y sus desafíos, *Organ. Latinoam. Desarro. Pesq.* (2009) 1–26.
- [65] M. Sacristán de Alva, V.M. Luna-Pabello, E. Cadena, E. Ortíz, Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 744–748. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.061.
- [66] E.J. Olguín, Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1031–1046. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.05.001.
- [67] L. Jiang, S. Luo, X. Fan, Z. Yang, R. Guo, Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂, *Appl. Energy.* 88 (2011) 3336–3341. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.043.
- [68] D.G. Kim, C. Lee, S.-M. Park, Y.-E. Choi, Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*., *Bioresour. Technol.* 159 (2014) 240–248. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.078.
- [69] F. Bumbak, S. Cook, V. Zachleder, S. Hauser, K. Kovar, Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 31–46. doi:10.1007/s00253-011-3311-6.
- [70] M. Ras, J.P. Steyer, O. Bernard, Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12 (2013) 153–164. doi:10.1007/s11157-013-9310-6.
- [71] X. Wen, Y. Geng, Y. Li, Enhanced lipid production in *Chlorella pyrenoidosa* by continuous culture., *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 297–303. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.077.
- [72] S. Ruangsomboon, M. Ganmanee, S. Choochote, Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 867–874. doi:10.1007/s10811-012-9956-4.
- [73] S. Venkata Mohan, M.P. Devi, Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae., *Bioresour. Technol.* 165 (2014) 288–94. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.103.
- [74] F. Guihéneuf, V. Mimouni, L. Ulmann, G. Tremblin, Combined effects of irradiance

- level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 369 (2009) 136–143. doi:10.1016/j.jembe.2008.11.009.
- [75] L. Xin, H. Hu, G. Ke, Y. Sun, Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5494–500. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.016.
- [76] F. Han, H. Pei, W. Hu, M. Song, G. Ma, R. Pei, Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state, *Energy Convers. Manag.* 90 (2015) 315–322. doi:10.1016/j.enconman.2014.11.032.
- [77] V.O. Adesanya, M.P. Davey, S.A. Scott, A.G. Smith, Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions., *Bioresour. Technol.* 157 (2014) 293–304. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.032.
- [78] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor., *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 100–112. doi:10.1002/bit.22033.
- [79] S.-J. Lee, S. Go, G.-T. Jeong, S.-K. Kim, Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (2011) 561–566. doi:10.1007/s12257-010-0360-0.
- [80] T. Ishika, P.A. Bahri, D.W. Laird, N.R. Moheimani, The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 1453–1464. doi:10.1007/s10811-017-1377-y.
- [81] P. Chaisutyakorn, J. Praiboon, C. Kaewsuralikhit, The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 37–45. doi:10.1007/s10811-017-1186-3.
- [82] M. Matsumoto, H. Sugiyama, Y. Maeda, R. Sato, T. Tanaka, T. Matsunaga, Marine diatom, *Navicula* sp. strain JPCC DA0580 and marine green alga, *Chlorella* sp. strain NKG400014 as potential sources for biodiesel production., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 483–490. doi:10.1007/s12010-009-8766-x.
- [83] A.E.F. Abomohra, M. El-Sheekh, D. Hanelt, Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock, *Renew. Energy.* 101 (2017) 1266–1272. doi:10.1016/j.renene.2016.10.015.
- [84] M.E. De Swaaf, L. Sijtsma, J.T. Pronk, High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*, *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 666–672. doi:10.1002/bit.10513.
- [85] C. Weldy, M. Huesemann, Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity, *J. Undergrad. Res.* (2007) 115–122. doi:10.1038/nrg2736.
- [86] J. Sheehan, T. Dunahay, J. Benemann, P. Roessler, A look back at the U. S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae, 1998. doi:10.2172/15003040.
- [87] L. Gouveia, A.C. Oliveira, Microalgae as a raw material for biofuels production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.

- [88] H. Tang, N. Abunasser, M.E.D. Garcia, M. Chen, K.Y. Simon Ng, S.O. Salley, Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel, *Appl. Energy*. 88 (2011) 3324–3330. doi:10.1016/j.apenergy.2010.09.013.
- [89] É.C. Francisco, D.B. Neves, E. Jacob-Lopes, T. Franco, Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 395–403. doi:10.1002/jctb.2338.
- [90] G. Breuer, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains., *Bioresour. Technol.* 124 (2012) 217–26. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.003.
- [91] S. Donghui, X. Bo, S. Jing, Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios, *J. Ocean Univ. China*. 15 (2016) 124–130. doi:10.1007/s11802-016-2797-z.
- [92] R. Huerlimann, R. de Nys, K. Heimann, Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production., *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 245–257. doi:10.1002/bit.22809.
- [93] A. Taleb, J. Pruvost, J. Legrand, H. Marec, B. Le-Gouic, B. Mirabella, B. Legeret, S. Bouvet, G. Peltier, Y. Li-Beisson, S. Taha, H. Takache, Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*, *Bioresour. Technol.* 177 (2015) 224–232. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.068.
- [94] A. San Pedro, C. V. González-López, F.G. Acién, E. Molina-Grima, Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 353–361. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.032.
- [95] C. Wan, F.W. Bai, X.Q. Zhao, Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01, *Biochem. Eng. J.* 78 (2013) 32–38. doi:10.1016/j.bej.2013.04.014.
- [96] S.Y. Chiu, C.Y. Kao, M.T. Tsai, S.C. Ong, C.H. Chen, C.S. Lin, Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 833–838. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.061.
- [97] C.-H. Su, L.-J. Chien, J. Gomes, Y.-S. Lin, Y.-K. Yu, J.-S. Liou, R.-J. Syu, Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process, *J. Appl. Phycol.* 23 (2010) 903–908. doi:10.1007/s10811-010-9609-4.
- [98] N. Gu, Q. Lin, G. Li, Y. Tan, L. Huang, J. Lin, Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179, *Eng. Life Sci.* 12 (2012) 631–637. doi:10.1002/elsc.201100204.
- [99] N. Moazami, R. Ranjbar, A. Ashori, M. Tangestani, A.S. Nejad, Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island, *Biomass and Bioenergy*. 35 (2011) 1935–1939. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.039.
- [100] S.M.U. Shah, C. Che Radziah, S. Ibrahim, F. Latiff, M.F. Othman, M.A. Abdullah, Effects of photoperiod, salinity and pH on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*, *Ann. Microbiol.* 64 (2013) 157–164. doi:10.1007/s13213-013-0645-6.
- [101] S.H. Oh, J.G. Han, Y. Kim, J.H. Ha, S.S. Kim, M.H. Jeong, H.S. Jeong, N.Y. Kim, J.S. Cho, W.B. Yoon, S.Y. Lee, D.H. Kang, H.Y. Lee, Lipid production in

- Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions, *J. Biosci. Bioeng.* 108 (2009) 429–434. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.05.020.
- [102] E. Del Río, A. Armendáriz, E. García-Gómez, M. García-González, M.G. Guerrero, Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil, *J. Biotechnol.* 195 (2015) 103–107. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.024.
- [103] G. Kim, C.H. Lee, K. Lee, Enhancement of lipid production in marine microalga *Tetraselmis* sp. through salinity variation, *Korean J. Chem. Eng.* 33 (2016) 230–237. doi:10.1007/s11814-015-0089-8.
- [104] S. Fon-Sing, M.A. Borowitzka, Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 1–14. doi:10.1007/s10811-015-0560-2.
- [105] G. Kim, J. Bae, K. Lee, Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp., *Bioresour. Technol.* 205 (2016) 274–279. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.045.
- [106] J. Msanne, D. Xu, A. Reddy, J.A. Casas-Mollano, T. Awada, E.B. Cahoon, H. Cerutti, Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169, *Phytochemistry.* 75 (2012) 50–59. doi:10.1016/j.phytochem.2011.12.007.
- [107] P. Singh, S. Kumari, A. Guldhe, R. Misra, I. Rawat, F. Bux, Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55 (2016) 1–16. doi:10.1016/j.rser.2015.11.001.
- [108] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J.* 54 (2008) 621–639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
- [109] C.-H. Hsieh, W.-T. Wu, Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation., *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3921–6. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019.
- [110] I.M. Remmers, A. Hidalgo-ulloa, B.P. Brandt, W.A.C. Evers, R.H. Wijffels, P.P. Lamers, Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.* 244 (2017) 1384–1392. doi:10.1016/j.biortech.2017.04.093.
- [111] R. Bajpai, A. Prokop, M. Zappi, *Algal Biorefineries. Volume 1: Cultivation of cells and products*, 2014.
- [112] L. Gigova, N. Ivanova, Microalgae respond differently to nitrogen availability during culturing, *J. Biosci.* 40 (2015) 365–374. doi:10.1007/s12038-015-9510-z.
- [113] Z. Ikarán, S. Suárez-Alvarez, I. Urreta, S. Castañón, The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3, *Algal Res.* 10 (2015) 134–144. doi:10.1016/j.algal.2015.04.023.
- [114] I. Pancha, K. Chokshi, B. George, T. Ghosh, C. Paliwal, R. Maurya, S. Mishra, Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, *Bioresour. Technol.* 156 (2014) 146–154. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.025.
- [115] J.R. Benavente-Valdés, C. Aguilar, J.C. Contreras-Esquível, A. Méndez-Zavala, J. Montañez, Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species, *Biotechnol. Reports J.* 10 (2016) 117–125. doi:10.1016/j.btre.2016.04.001.

- [116] Y. Nakamura, Y. Li-beisson, *Lipids in Plant and Algae Development*, Springer, Switzerland, 2016. doi:10.1007/978-3-319-25979-6.
- [117] B. Gikonyo, *Advances in biofuel production: Algae and aquatic plants*, CRC Press, Oakville, Canada, 2014.
- [118] A.J. Klok, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, Edible oils from microalgae: Insights in TAG accumulation, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 521–528. doi:10.1016/j.tibtech.2014.07.004.
- [119] P. Singh, A. Guldhe, S. Kumari, I. Rawat, F. Bux, Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology, *Biochem. Eng. J.* 94 (2015) 22–29. doi:10.1016/j.bej.2014.10.019.
- [120] G.J.O. Martin, D.R.A. Hill, I.L.D. Olmstead, A. Bergamin, M.J. Shears, D.A. Dias, S.E. Kentish, P.J. Scales, C.Y. Botte, D.L. Callahan, Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp . (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp . (Eustigmatophyceae), *PLoS One.* 9 (2014) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0103389.
- [121] K.K. Sharma, H. Schuhmann, P.M. Schenk, High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Energies.* 5 (2012) 1532–1553. doi:10.3390/en5051532.
- [122] Y. Li, X. Fei, X. Deng, Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*, *Biomass and Bioenergy.* 42 (2012) 199–211. doi:10.1016/j.biombioe.2012.03.010.
- [123] H.W. Yen, I.C. Hu, C.Y. Chen, S.H. Ho, D.J. Lee, J.S. Chang, Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 166–174. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.099.
- [124] Li, F.J. Zhao, D.D. Yu, Effect of Nitrogen Limitation on cell growth , lipid accumulation and gene expression in *Chlorella sorokiniana*, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 58 (2015) 462–467.
- [125] A.K. Minhas, P. Hodgson, C.J. Barrow, A. Adholeya, A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–19. doi:10.3389/fmicb.2016.00546.
- [126] A. Richmond, Q. Hu, *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*, Wiley Blackwell, Sussex, UK, 2013. doi:10.1002/9781118567166.
- [127] F. Tan, Z. Wang, S. Zhouyang, H. Li, Y. Xie, Y. Wang, Y. Zheng, Q. Li, Nitrogen and phosphorus removal coupled with carbohydrate production by five microalgae cultures cultivated in biogas slurry, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 385–393. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.030.
- [128] C.Y. Chen, X.Q. Zhao, H.W. Yen, S.H. Ho, C.L. Cheng, D.J. Lee, F.W. Bai, J.S. Chang, Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochem. Eng. J.* 78 (2013) 1–10. doi:10.1016/j.bej.2013.03.006.
- [129] K.H. Kim, I.S. Choi, H.M. Kim, S.G. Wi, H.J. Bae, Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation, *Bioresour. Technol.* 153 (2014) 47–54. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.059.
- [130] J. Trivedi, M. Aila, D.P. Bangwal, S. Kaul, M.O. Garg, Algae based biorefinery—How to make sense?, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47 (2015) 295–307. doi:10.1016/j.rser.2015.03.052.

- [131] R. Bibi, Z. Ahmad, M. Imran, S. Hussain, A. Ditta, S. Mahmood, A. Khalid, Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71 (2017) 976–985. doi:10.1016/j.rser.2016.12.126.
- [132] L.M. Chng, D.J.C. Chan, K.T. Lee, Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*, *J. Clean. Prod.* 130 (2015) 68–73. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.016.
- [133] S.H. Ho, Y. Di Chen, C.Y. Chang, Y.Y. Lai, C.Y. Chen, A. Kondo, N.Q. Ren, J.S. Chang, Feasibility of CO₂ mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: Effects of seasonal changes, *Biotechnol. Biofuels.* 10 (2017) 1–13. doi:10.1186/s13068-017-0712-5.
- [134] S. V. Vassilev, C.G. Vassileva, Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview, *Fuel.* 181 (2016) 1–33. doi:10.1016/j.fuel.2016.04.106.
- [135] L. Sanchez Rizza, M.E. Sanz Smachetti, M. Do Nascimento, G.L. Salerno, L. Curatti, Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol, *Algal Res.* 22 (2017) 140–147. doi:10.1016/j.algal.2016.12.021.
- [136] S.H. Ho, S.W. Huang, C.Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.S. Chang, Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 191–198. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.015.
- [137] O.K. Lee, Y.K. Oh, E.Y. Lee, Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1, *Bioresour. Technol.* 196 (2015) 22–27. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.040.
- [138] G. Markou, I. Angelidaki, D. Georgakakis, Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 631–645. doi:10.1007/s00253-012-4398-0.
- [139] R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, P.M. Slegers, L.B. Brentner, A. Roy, M.J. Barbosa, Food commodities from microalgae, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013) 169–177. doi:10.1016/j.copbio.2012.09.012.
- [140] C.E. de Farias Silva, A. Bertucco, Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook, *Process Biochem.* 51 (2016) 1833–1842. doi:10.1016/j.procbio.2016.02.016.
- [141] S.A. Jambo, R. Abdulla, S.H. Mohd Azhar, H. Marbawi, J.A. Gansau, P. Ravindra, A review on third generation bioethanol feedstock, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 65 (2016) 756–769. doi:10.1016/j.rser.2016.07.064.
- [142] Y. Wang, W. Guo, H.W. Yen, S.H. Ho, Y.C. Lo, C.L. Cheng, N. Ren, J.S. Chang, Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 619–625. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.067.
- [143] B. Kiran, R. Kumar, D. Deshmukh, Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy, *Energy Convers. Manag.* 88 (2014) 1228–1244. doi:10.1016/j.enconman.2014.06.022.
- [144] L. Zhu, Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41 (2015) 1376–1384. doi:10.1016/j.rser.2014.09.040.

- [145] A.C. Redfield, On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton, Univ. Press Liverpool, James Johnstone Meml. Vol. (1934) 176–192. doi:citeulike-article-id:11236440.
- [146] K. Grasshoff, K. Kremling, M. Ehrhardt, Methods of Seawater Analysis, Third, Wiley-VCH, Germany, 1999.
- [147] B. Schnetger, C. Lehnert, Determination of nitrate plus nitrite in small volume marine water samples using vanadium(III)chloride as a reduction agent, Mar. Chem. 160 (2014) 91–98. doi:10.1016/j.marchem.2014.01.010.
- [148] APHA, AWWA, WEF, Standard methods for the examination of water and wastewater., 20th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C., 1998.
- [149] I. Vyrides, D.C. Stuckey, A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics., Bioresour. Technol. 100 (2009) 979–82. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.038.
- [150] Y. Gong, M. Jiang, Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, Biotechnol. Lett. 33 (2011) 1269–1284. doi:10.1007/s10529-011-0574-z.
- [151] A. Demirbas, M. Fatih Demirbas, Importance of algae oil as a source of biodiesel, Energy Convers. Manag. 52 (2011) 163–170. doi:10.1016/j.enconman.2010.06.055.
- [152] E. Molina, E. Martínez, S. Sánchez, F. García, A. Contreras, The influence of temperature and the initial N : P ratio on the growth of microalgae Tetraselmis sp., Process Biochem. 26 (1991) 183–187.
- [153] S. Mobin, F. Alam, Some promising microalgal species for commercial applications: A review, Energy Procedia. 110 (2017) 510–517. doi:10.1016/j.egypro.2017.03.177.
- [154] M. Sacristan De Alva, Producción de biodiesel a partir de microalgas empleando diferentes calidades de agua, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [155] E. Safonova, K. V. Kvitko, M.I. Iankevitch, L.F. Surgko, I.A. Afti, W. Reisser, Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia, Eng. Life Sci. 4 (2004) 347–353. doi:10.1002/elsc.200420039.
- [156] L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang, R. Ruan, Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, Appl. Biochem. Biotechnol. 162 (2010) 1174–1186. doi:10.1007/s12010-009-8866-7.
- [157] S.K. Mishra, W.I. Suh, W. Farooq, M. Moon, A. Shrivastav, M.S. Park, J.-W. Yang, Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method., Bioresour. Technol. 155 (2014) 330–3. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.077.
- [158] T.T.Y. Doan, J.P. Obbard, Improved Nile Red staining of Nannochloropsis sp., J. Appl. Phycol. 23 (2011) 895–901. doi:10.1007/s10811-010-9608-5.
- [159] A. de la Jara, H. Mendoza, A. Martel, C. Molina, L. Nordstron, V. de la Rosa, R. Diaz, Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, <Emphasis Type="Italic">Crypthecodinium cohnii</Emphasis>, J. Appl. Phycol. 15 (2003) 433–438.
- [160] H. Mendoza Guzmán, A. de la Jara Valido, K. Freijanes Presmanes, L. Carmona Duarte, Quick estimation of intraspecific variation of fatty acid composition in Dunaliella salina using flow cytometry and Nile Red, J. Appl. Phycol. 24 (2012) 1237–1243. doi:10.1007/s10811-011-9768-y.

- [161] R. Divakaran, V.N.S. Pillai, Flocculation of algae using chitosan, *J. Appl. Phycol.* 14 (2002) 419–422.
- [162] S. Chinnasamy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das, Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3097–3105. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.026.
- [163] J. Jones, S. Manning, M. Montoya, K. Keller, M. Poenie, Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2012) 1371–1381. doi:10.1007/s11746-012-2044-8.
- [164] X. Yin, H. Ma, Q. You, Z. Wang, J. Chang, Comparison of four different enhancing methods for preparing biodiesel through transesterification of sunflower oil, *Appl. Energy.* 91 (2012) 320–325. doi:10.1016/j.apenergy.2011.09.016.
- [165] AOCS Cd 3a-63, Acid Value of Fats and Oils, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 1988.
- [166] AOCS Cd 3-25, Saponification Value of Fats and Oils, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 1988.
- [167] ASTM D974, Acid and Base Number by Color-Indicator Titration, ASTM International, 2014.
- [168] EN-14111, Fat and oil derivatives - Fatty Acid methyl Esters (FAME) - Determination of iodine value, EN Standards, 2003.
- [169] F. David, A.K. Vickers, P. Sandra, Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters, 2005.
- [170] G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel, *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th Metcal, McGraw Hill, 2003.
- [171] O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. De-Bashan, Y. Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products, *Water Res.* 45 (2011) 11–36. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037.
- [172] A.M.J. Kliphuis, A.J. Klok, D.E. Martens, P.P. Lamers, M. Janssen, R.H. Wijffels, Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 253–266. doi:10.1007/s10811-011-9674-3.
- [173] A. Patel, S. Barrington, M. Lefsrud, Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms, *GCB Bioenergy.* 4 (2012) 485–495. doi:10.1111/j.1757-1707.2012.01159.x.
- [174] L.A. Garay, K.L. Boundy-Mills, J.B. German, Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 2709–2727. doi:10.1021/jf4042134.
- [175] J.J. Mayers, K.J. Flynn, R.J. Shields, Influence of the N : P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp ., *Bioresour. Technol.* 169 (2014) 588–595. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.048.
- [176] H.J. Choi, S.M. Lee, Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 761–766. doi:10.1007/s00449-014-1317-z.
- [177] N.W. Rasdi, J.G. Qin, Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*, *J. Appl. Phycol.* 27 (2015) 2221–2230. doi:10.1007/s10811-014-0495-z.
- [178] S.K. Lenka, N. Carbonaro, R. Park, S.M. Miller, I. Thorpe, Y. Li, Current advances

- in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 1046–1063. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.06.004.
- [179] L.D. Zhu, Z.H. Li, E. Hiltunen, Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016) 1–8.
- [180] A. V. Quinlan, A semicontinuous culture model that links cell growth to extracellular nutrient concentration, *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986) 1455–1461. doi:10.1002/bit.260281002.
- [181] N.R. Moheimani, Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) in bag photobioreactors, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 167–176. doi:10.1007/s10811-012-9850-0.
- [182] ASTM, ASTM D6751-12 Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, 2013.
- [183] European Committee for Standardization, UNE-EN 14214:2013 Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods, (2013) 22. doi:ISBN 978 0 580 70781 0.
- [184] Z. Reyimu, D. Özçimen, Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production, *J. Clean. Prod.* 150 (2017) 40–46. doi:10.1016/j.jclepro.2017.02.189.
- [185] P.S.C. Schulze, C.F.M. Carvalho, H. Pereira, K.N. Gangadhar, L.M. Schüler, T.F. Santos, J.C.S. Varela, L. Barreira, Urban wastewater treatment by *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta), *Bioresour. Technol.* 223 (2017) 175–183. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.027.
- [186] Y.L. Zhao, A. Dolat, Y. Steinberger, X. Wang, A. Osman, G.H. Xie, Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel, *F. Crop. Res.* 111 (2009) 55–64. doi:10.1016/j.fcr.2008.10.006.

Anexo I. Descargas de aguas residuales en territorio mexicano

En el artículo 276 de la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua se menciona:

“Están obligados a pagar el derecho por uso o aprovechamiento de bienes del dominio público de la Nación como cuerpos receptores de las descargas de aguas residuales, las personas físicas o morales que descarguen en forma permanente, intermitente o fortuita aguas residuales en ríos, cuencas, cauces, vasos, aguas marinas y demás depósitos o corrientes de agua, así como los que descarguen aguas residuales en los suelos o las infiltren en terrenos que sean bienes nacionales o que puedan contaminar el subsuelo o los acuíferos, en términos de lo dispuesto en esta Ley. El pago del derecho a que se refiere este artículo no exime a los responsables de las descargas de aguas residuales de cumplir con los límites máximos permisibles establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas y con las condiciones particulares de sus descargas, de conformidad con la Ley de Aguas Nacionales.”

En el artículo 277-A dice que el pago del derecho se calculará por el volumen descargado por trimestres. El artículo 277-B establece las cuotas para personas físicas y morales que deben pagarse por cada metro cúbico descargado según el tipo de cuerpo de agua al que se descargue:

Cuerpos Receptores		
Tipo A	Tipo B	Tipo C
MX\$14.96	MX\$21.29	MX\$32.99

Para el caso de la industria de la maricultura las descargas se hacen por lo general en cuerpos de agua tipo A que son las descargas efectuadas desde plataformas marinas. Ya que los tipos B y C son ríos, arroyos, acuíferos, lagunas, entre otros.

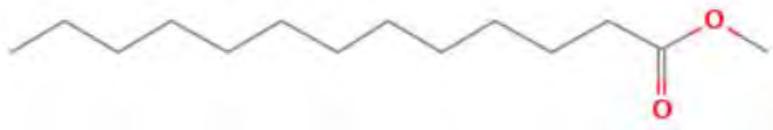
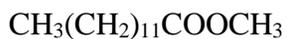
Esto quiere decir que por cada metro cúbico de agua descargada se tienen que pagar \$14.96 pesos mexicanos. La norma aplicable para la descarga es la NOM-001-SEMARNAT1996, que establece como límite máximo permisible para descarga en aguas costeras es un promedio mensual de 150 mg L⁻¹ de DBO₅ (en el caso del agua obtenida en este trabajo no se midió la DBO₅, sin embargo por el tipo de agua los valores de DBO₅ Y DQO no deben diferir mucho ya que la mayor parte de los contaminantes son biodegradables, el contenido de DQO del efluente de este trabajo es de alrededor de 50 mg L⁻¹) y no aplica para nitrógeno total ni para fósforo total. Desafortunadamente esto no implica grandes ahorros al llevar a cabo un tratamiento de las aguas debido a que el pago por descarga se debe hacer siempre ya que el agua residual descargada debe cumplir con la NOM-001-SEMARNAT-1996 y la DBO₅ probablemente se puede reducir a los límites permisibles con solamente un tratamiento de cribado ya que esta se debe principalmente al alimento no ingerido por las especies y a las heces de las especies y no se debe cumplir con un límite máximo para nitrógeno ni para fósforo.

Nombre y estructura de los metil ésteres de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído de

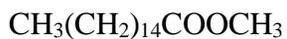
Nombre y nombre común

Fórmula semidesarrollada y estructura

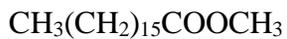
ácido tridecanoico



ácido hexadecanoico

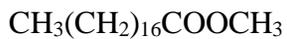


ácido heptadecanoico



ácido octadecanoico

(el ácido esteárico)



Nombre químico y nombre común

Fórmula semidesarrollada y estructura



Metil éster del ácido (Z)-9-octadecenoico
(metil éster del ácido oleico)

