



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE CULTIVOS DE MICROALGAS  
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES ACOPLADO A  
LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CARLOS ANTONIO GONZÁLEZ PALMA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE CIENCIAS DE MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN,  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**Ciudad de México, agosto 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



EVALUACIÓN COMPARATIVA DE CULTIVOS DE MICROALGAS  
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES ACOPLADO A  
LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIÓL. CARLOS ANTONIO GONZÁLEZ PALMA

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE CIENCIAS DE MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA  
MAZATLÁN, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MÉXICO, Ciudad de México, agosto 2019**

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo económico otorgado por el CONACYT a través de la beca 478515 otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias dentro del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el financiamiento de materiales y reactivos proporcionado por el Proyecto UNAM/DGAPA PAPIIT IT202818 “Desarrollo de una estrategia para el tratamiento de aguas residuales de maricultura empleando microalgas y aprovechamiento de la biomasa producida” y de los fondos PAIP VMLP clave: 5000-9111 (periodo 2017-2019) otorgados por la Facultad de química de la UNAM.

Se agradece el apoyo técnico proporcionado por el M. en C. Luciano Hernández Gómez.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por recibirme en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez y el Dr. Alfredo Martínez Jiménez por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el desarrollo del proyecto.

A los miembros de mi jurado de examen la Dra. Isaura Falcón Álvarez y la Dra. Gabriela Gaxiola por sus revisiones sobre mi proyecto.

Agradecimiento por la donación de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis chui*, *Dunaliella* sp. al Laboratorio de Producción de alimento vivo UMDI Sisal Facultad de Ciencias UNAM a cargo de la M en C Iveth Gabriela Palomino Albarrán y Técnico Auxiliar Patricia Balam Uc.

Al Dr. Manuel Sacristán de Alba, el M. en C. Andrés Clairin Savage y la P. de Q.A. Alejandra Arreola por su asesoría técnica.

## **Agradecimientos personales**

A mis padres Marco Antonio y Bety, mis hermanos Jean Marco y Diego, sin ellos no sería absolutamente nada.

A mis amigos del grupo Esporopolignina: Alejandro Cisneros, Alejandro Gaona, Elizabeth Rosales, Alondra Vega, Armando Rodríguez, Cristina Ramírez, Yaravy Giselle, Ulises López Mora, Ivan Linares, Valeria Falcón y los que me faltaron.

Al Arsenal FC, la válvula de escape dominical.

A los Ramones del CCH Naucalpan: Mónica, Raymundo, Rafael, Caro, Sara, Miriam y Jonathan.

A los incansables Pabello Corps, Manuel Sacristán, Andrés Savage, Jorge, Luis A., Luis E., Alejandra, Paola, Catalina Child, Cicerón, Ana, Inna, Laura, Damián, Erick, Lalo, Arturo y Paola Andrea.

A mi compañera Jazmín, por acompañarme desde el principio hasta el final de este tramo, te quiero.

*Life is locomotion... if you're not moving, you're not living. But there comes a time when you've got to stop running away from things... and you've got to start running towards something, you've got to forge ahead. Keep moving. Even if your path isn't lit... trust that you'll find your way*

*Barry Allen*

## INDICE

INDICE DE TABLAS .....	VI
INDICE DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I. MARCO TEÓRICO .....	3
1.1 Camaronicultura .....	3
1.2 Biotecnología de microalgas .....	8
1.3 Co-cultivos .....	12
1.4 Microalgas en el tratamiento de aguas residuales .....	15
II. JUSTIFICACIÓN .....	20
III. HIPOTESIS .....	21
IV. OBJETIVOS .....	21
4.1 Objetivo general .....	21
4.2 Objetivos particulares .....	21
V. METODOLOGÍA .....	22
5.1 Etapa 1 .....	22
5.2 Etapa 2 .....	27
5.3 Análisis estadístico .....	30
VI. RESULTADOS .....	31
6.1 Control .....	31
6.2 Cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	37
6.3 Cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	44
6.4 Cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	51
6.5 Cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	58
6.6 Cultivo <i>Tetraselmis chui</i> - <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	65
6.7 Cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>Tetraselmis chui</i> .....	71
6.8 Cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	78
VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN .....	86
7.1 Ortofosfatos .....	86
7.2 Amonio .....	90

7.3 Nitritos .....	95
7.4 Nitratos .....	99
7.5 DQO .....	102
7.6 Biomasa seca .....	106
7.7 Lípidos .....	112
7.8 Lípidos vs. Nitrógeno .....	117
7.9 Co-cultivo .....	122
VIII. CONCLUSIONES .....	129
IX. PERSPECTIVAS .....	130
BIBLIOGRAFIA .....	131
ANEXO .....	139

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Calidad del agua de diferentes efluentes de estanques de camaronicultura .....	7
Tabla 2. Composición de agua residual sintética de acuicultura de camarón (Sacristán de Alva, 2018). .....	23
Tabla 3. Composición del Fertilizante Hidrosoluble Peters 20-20-20. ....	23
Tabla 4. Pruebas utilizadas en el monitoreo de los cultivos. ....	25
Tabla 5. Concentración de ortofosfatos en el cultivo control. ....	31
Tabla 6. Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo control. ....	31
Tabla 7. Concentración de nitritos en el en el cultivo control. ....	32
Tabla 8. Concentración de nitratos en el cultivo control. ....	32
Tabla 9. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo control. ....	33
Tabla 10. Densidad óptica del cultivo control. ....	33
Tabla 11. Peso seco de la biomasa en el cultivo control. ....	34
Tabla 12. Demanda química de oxígeno en el cultivo control. ....	34
Tabla 13. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	37
Tabla 14. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	37
Tabla 15. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	38
Tabla 16. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	39
Tabla 17. Concentración de lípidos en la biomasa de <i>Dunaliella</i> sp. ....	39
Tabla 18. Densidad óptica de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. ....	40
Tabla 19. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. ....	40
Tabla 20. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp. ....	41
Tabla 21. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	44
Tabla 22. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	44
Tabla 23. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	45
Tabla 24. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	46
Tabla 25. Concentración de lípidos en la biomasa de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	46
Tabla 26. Densidad óptica de los cultivos de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	47
Tabla 27. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	47
Tabla 28. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	48

Tabla 29. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	51
Tabla 30. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	52
Tabla 31. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	52
Tabla 32. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	53
Tabla 33. Concentración de lípidos en la biomasa de <i>Tetraselmis chui</i> .....	53
Tabla 34. Densidad óptica de los cultivos de <i>Tetraselmis chui</i> .....	54
Tabla 35. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Tetraselmis chui</i> .....	54
Tabla 36. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Tetraselmis chui</i> .....	55
Tabla 37. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	58
Tabla 38. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	59
Tabla 39. Concentración de nitritos amoniacal en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	59
Tabla 40. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	60
Tabla 41. Concentración de lípidos en la biomasa de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	60
Tabla 42. Densidad óptica de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	61
Tabla 43. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	61
Tabla 44. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> .....	62
Tabla 45. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	65
Tabla 46. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	65
Tabla 47. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	66
Tabla 48. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	66
Tabla 49. Concentración de lípidos en la biomasa de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	67
Tabla 50. Densidad óptica de los cultivos de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	67
Tabla 51. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	68
Tabla 52. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	68
Tabla 53. Concentración de ortofosfatos en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	71
Tabla 54. Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	72
Tabla 55. Concentración de nitritos en el en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	72
Tabla 56. Concentración de nitratos en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	73
Tabla 57. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	73
Tabla 58. Densidad óptica del cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	74
Tabla 59. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	74
Tabla 60. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> .....	75
Tabla 61. Concentración de ortofosfatos en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	78
Tabla 62. Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	78
Tabla 63. Concentración de nitritos en el en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	79
Tabla 64. Concentración de nitratos en el cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	79
Tabla 65. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	80
Tabla 66. Densidad óptica del cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	80
Tabla 67. Peso seco de la biomasa en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	81
Tabla 68. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	81
Tabla 69. Concentración de clorofila en la biomasa del cultivo <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	82
Tabla 70. Conteo celular <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> .....	82
Tabla 71. Abreviaturas para los cultivos .....	86
Tabla 72. Estadísticos de ANOVA para el PO <sub>4</sub> día 15. ....	86
Tabla 73. Student-Newman-Keuls test para PO <sub>4</sub> Día 15. ....	88
Tabla 74. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de PO <sub>4</sub> en función de los días y cultivo. ....	88



Tabla 75. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NH <sub>4</sub> .....	91
Tabla 76. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NH <sub>4</sub> Día 15. ....	91
Tabla 77. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NH <sub>4</sub> en función de los días y cultivo. ....	93
Tabla 78. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NO <sub>2</sub> . ....	95
Tabla 79. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NO <sub>2</sub> Día 15. ....	95
Tabla 80. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NO <sub>2</sub> en función de los días y cultivo. ....	96
Tabla 81. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NO <sub>3</sub> . ....	99
Tabla 82. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NO <sub>3</sub> Día 15. ....	99
Tabla 83. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NO <sub>3</sub> en función de los días y cultivo. ....	100
Tabla 84. Estadísticos de ANOVA para el día 15 DQO. ....	103
Tabla 85. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para DQO Día 15.....	103
Tabla 86. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de DQO en función de los días y cultivo. ....	104
Tabla 87. Estadísticos de ANOVA para el día 15 Peso seco. ....	107
Tabla 88. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para Peso Seco Día 15. ....	107
Tabla 89. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de Peso Seco. ....	108
Tabla 90. Productividades de biomasa y lípidos registradas en otros estudios. ....	111
Tabla 91. Estadísticos de ANOVA para el día 15 Lípidos.....	113
Tabla 92. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para Lípidos Día 15. ....	113
Tabla 93. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de Lípidos.....	115
Tabla 94. Datos de Nitrógeno Total.....	117
Tabla 95. Estadísticos de ANOVA para la concentración de Lípidos en función del Nitrógeno Total. ....	118
Tabla 96. Estadísticos de ANOVA para la influencia de los co-cultivos. ....	122
Tabla 97. Resumen de remociones y productividades. ....	127
Tabla 98. Límites permisibles de descarga en los efluentes provenientes de la acuicultura. ....	128

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la relación entre la acuicultura y el medio ambiente. Modificado de Herath y Satoh (2015).....	4
Figura 2. Productos que pueden sintetizados por cepas de microalgas y áreas de aplicación. Modificado de Koller et al. (2014).....	7
Figura 3. Ejemplos de reactores de cultivo. Modificado de Chisti (2007). ....	8
Figura 4. Esquema de la acumulación de lípidos promovida por la deficiencia de nitrógeno. Durante la limitación de nitrógeno, las vías marcadas con flechas discontinuas son utilizadas para la producción de lípidos. Las rutas indicadas con X se inhiben debido al efecto de una reducción en la tasa fotosintética, la cual disminuye la fijación de carbono a través de la fotosíntesis, así como la síntesis de proteínas. Tomado de Sacristán de Alva et al. (2018). ....	10
Figura 5. Procesos de tratamiento de aguas residuales. Tomado de Rawat et al. (2011). ....	15
Figura 6. Oxigenación por fotosíntesis en el proceso de eliminación de DBO. ....	16
Figura 7. Esquema de la estrategia de trabajo de la primera parte del proyecto.....	21
Figura 8. Microalgas utilizadas en el proyecto. A. <i>Tetraselmis chuii</i> B. <i>Nannochloropsis oculata</i> C. <i>Dunaliella</i> sp. ....	23
Figura 9. Esquema del cultivo por lotes utilizado para el cultivo de las cepas microalgales.....	24
Figura 10. Acondicionamiento de la cámara de cultivo. A) Las lámparas PAR son funcionales, pero la intensidad de luz no es homogénea B) La iluminación LED permite brindar la misma radiación a todos los cultivos. ....	26
Figura 11. Esquema de trabajo de la segunda etapa del proyecto.....	28
Figura 12. Perfil de remoción en los cultivos control. a) Amonio, b) Nitratos, c) Nitritos. D) Ortofosfatos. ....	34

Figura 13. Perfil de remoción en los cultivos control. a) Densidad óptica, b) Demanda química de oxígeno, c) Peso seco, d) Lípidos. ....	35
Figura 14. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos. ....	41
Figura 15. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp. a) Lípidos, b) Demanda química de oxígeno, c) Densidad óptica, d) Peso seco. ....	42
Figura 16. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Nannochloropsis oculata</i> . a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos ....	48
Figura 17. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Nannochloropsis oculata</i> . a) Lípidos, b) Demanda química de oxígeno, c) Densidad óptica, d) Peso seco. ....	49
Figura 18. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Tetraselmis chui</i> . a) Ortofosfatos, b) Nitratos, c) Nitritos, d) Amonio.....	55
Figura 19. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Tetraselmis chui</i> . a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno. ....	56
Figura 20. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> . a) Amonio, b) Nitritos, c) Nitratos, d) Ortofosfatos. ....	62
Figura 21. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> . a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno.....	63
Figura 22. Perfil de remoción en los cultivos de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> . a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos.....	68
Figura 23. Perfil de remoción en los cultivos de <i>T. chui</i> - <i>N. oculata</i> . a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno ....	69
Figura 24. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> . a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos. ....	75
Figura 25. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>T. chui</i> . a) Densidad óptica, b) Peso seco, c) Demanda Química de Oxígeno, d) Lípidos.....	76
Figura 26. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> . a) Amonio, b) Nitritos, c) Nitratos, d) Ortofosfatos.....	82
Figura 27. Perfil de remoción en los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> . a) Densidad óptica, b) Demanda Química de Oxígeno, c) Lípidos, d) Peso seco.....	83
Figura 28. Perfil de los cultivos de <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> - <i>T. chui</i> . a) Clorofila b) Conteo celular.....	84
Figura 29. Concentraciones finales de PO <sub>4</sub> por cultivo.....	86
Figura 30. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de PO <sub>4</sub> .....	88
Figura 31. PO <sub>4</sub> en función del tiempo. ....	89
Figura 32. Concentraciones finales de NH <sub>4</sub> por cultivo.....	91
Figura 33. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de NH <sub>4</sub> .....	91
Figura 34. NH <sub>4</sub> en función del tiempo. ....	93
Figura 35. Concentraciones finales de NO <sub>2</sub> por cultivo.....	95
Figura 36. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de NO <sub>2</sub> .....	96
Figura 37. Concentración de nitritos en función del tiempo. ....	97
Figura 38. Concentraciones finales de NO <sub>3</sub> por cultivo.....	99
Figura 39. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de NO <sub>3</sub> .....	100
Figura 40. NO <sub>3</sub> en función del tiempo. ....	101
Figura 41. Concentraciones finales de DQO por cultivo. ....	103
Figura 42. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de DQO. ....	104
Figura 43. DQO en función del tiempo. ....	105

Figura 44. Concentraciones finales de Peso Seco por cultivo.....	107
Figura 45. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de Peso Seco.....	108
Figura 46. Peso seco en función del tiempo.....	109
Figura 47. Concentraciones finales de Lípidos en biomasa por cultivo.....	113
Figura 48. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de Lípidos.....	115
Figura 49. Lípidos en función de tiempo.....	115
Figura 50. Concentración de Lípidos en función del Nitrógeno Total.....	118
Figura 51. Comparación de concentración Nitrógeno vs Lípidos. A) <i>Dunaliella</i> sp., B) <i>Nannochloropsis oculata</i> , C) <i>Dunaliella</i> sp.- <i>N. oculata</i> , D) <i>Tetraselmis chui</i> .....	119
Figura 52. Comparación de concentración Nitrógeno vs Lípidos. a) <i>Dunaliella</i> sp.- <i>Tetraselmis chui</i> . b) <i>Dunaliella</i> sp.- <i>Nannochloropsis oculata</i> - <i>T. chui</i> . c) Nitrógeno total. D) <i>Tetraselmis chui</i> - <i>N. oculata</i> .....	120

## RESUMEN

La camaronicultura es una actividad productiva que se ha incrementado rápidamente en los últimos 30 años. Su vertiginoso progreso ha sido acompañado de una amplia variedad de problemáticas ambientales, entre las cuales, el desecho al mar de aguas residuales, sin tratar, es una de las más importantes, dado el impacto negativo que genera en los ecosistemas costeros.

Una de las alternativas para el tratamiento de aguas residuales de la acuicultura es la “ficorremediación”, que es el proceso de depuración mediante el cultivo de microalgas. Este proceso ha sido implementado como sistema de tratamiento de contaminantes nitrogenados y fosforados, resultando en doble efecto, por un lado, reduciendo el contenido de dichos contaminantes y, por otro, produciendo biomasa algal de la cual es posible obtener subproductos económicamente valiosos.

En este estudio se cultivaron las especies de microalgas marinas *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis chui* en un ambiente controlado que simulaba la calidad de agua propia de un efluente residual de camaronicultura. Se utilizaron sistemas de cultivo en lote, operados de manera discontinua, con inducción de estrés por carencia de nitrógeno en la fase estacionaria de crecimiento. Asimismo, se evaluó la capacidad de remoción de nutrientes, generación de biomasa y acumulación de lípidos de las tres microalgas al ser cultivadas por separado y en conjunto.

Los resultados indican que el proceso de co-cultivo tuvo una influencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) sobre las tasas de remoción y concentraciones finales de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , DQO, lípidos y biomasa de los diferentes cultivos de microalgas. No obstante, tal influencia resultó diferencialmente positiva o negativa dependiendo del tratamiento proporcionado. Los resultados del co-cultivo dependen enteramente de las especies de microalgas presentes en la mezcla y de las interacciones que estas puedan desarrollar durante su crecimiento.

## ABSTRACT

Shrimp farming is an economic activity that has grown rapidly during the last 30 years. However, its darting progress has come along with a great variety of environmental problems. One of the activities with the greatest negative's impact on coastal ecosystems is the drainage to the sea of untreated sewage. One alternative for aquaculture sewage treatment is "phycoremediation", a microalgae culture-driven cleanup technique. This process has been implemented as a nitrogen and phosphorous contaminant treatment system, resulting, on the one hand, in the decrease of the content of these pollutants and, on the other, in the production of algal biomass from which it is possible to obtain economically valuable by-products. In this study seaweed of the *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chui* species were cultured in an environment emulating the water quality typical of the residual effluent of shrimp farming. Discontinuous batch culture systems were used, inducing stress conditions by nitrogen shortage during growth stationary phase. Likewise, nutrient removal, biomass production and lipid accumulation were evaluated for the three species, separately and together. Results show that the co-culture process had a statistically significative ( $\alpha=0.05$ ) influence on the removal rate and on the  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , COD, lipid and biomass final concentrations for every microalgae culture. However, such influence was positive or negative depending on the provided treatment. Different results depend entirely on the microalgae present in the mixture and its possible interactions during growth.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Camaronicultura

La producción acuícola es una actividad que ha tenido una tendencia a crecer globalmente debido a un progresivo aumento de la demanda de productos acuícolas, provocado por la necesidad de nuevos suministros de alimentos (Tovar *et al.*, 2000; Harache, 2002).

Tan solo en el año de 2012, la industria acuícola global contribuyó con el 45% de la producción mundial de pescado comestible. El rápido desarrollo del sector se puede atribuir a factores tales como: la disminución por sobreexplotación de las poblaciones de peces oceánicos, la alta demanda del mercado, la aparición y rápida introducción de nuevas tecnologías, así como al aumento de la comercialización en la industria (Jones *et al.*, 2015).

Como cualquier actividad productiva, el desarrollo de la acuicultura ha ido de la mano con la aparición de una amplia variedad de problemáticas ambientales. Entre estas podemos mencionar: la modificación del paisaje, el cambio en la biodiversidad o la introducción de especies exóticas (Kautsky *et al.*, 2000; Naylor *et al.*, 2002). Sin embargo, uno de los problemas más importantes de esta industria, es su dependencia de ingredientes de origen marino (como la harina y aceite de pescado) para la fabricación de alimentos formulados, por lo cual, desde hace años se ha trabajado en la búsqueda de sustitutos que puedan suplir total o parcialmente a estos ingredientes, los cuales contribuyen con hasta un 50% del costo de alimentación (Ju *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2016).

La *Food and Agriculture Organization* (FAO) en su informe “*The State of World Fisheries and Aquaculture*” de 2012, tiene registro de 527 especies de organismos acuáticos explotados por la acuicultura. Este listado incluye tanto plantas como animales (Boyd y McNevin, 2015), no obstante, existen algunas especies que por sus características autoecológicas, suelen ser sumamente rentables si se tiene una gestión inteligente de los sistemas de cultivo y las condiciones ambientales apropiadas.

La camaronicultura hace uso principalmente de cuatro especies de camarón: *Penaeus stylirostris*, *P. californiensis*, *P. brevirostris* y *Litopenaeus vannamei*, siendo este último el más importante, ya que ha alcanzado una alta rentabilidad y demanda en regiones como América del Norte, Europa y Japón, lo que ha llevado a la expansión de su producción a zonas costeras bajas tropicales como Asia y el Pacífico, donde se produce el 72% de los camarones cultivados en todo el mundo (Anh *et al.*, 2010).

A diferencia de los países del sudeste asiático, la acuicultura del camarón en México es una práctica muy reciente, que desde 1985 ha tenido un crecimiento que llevo al país a convertirse en el segundo mayor productor de camarón (principalmente *L. vannamei* y *P. stylirostris*) en el hemisferio occidental (Páez-Osuna *et al.*, 1999; Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Alrededor del 97% de los estanques de acuicultura de camarón en México, se encuentran en el Golfo de California (estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit al noreste del país), zona que se caracteriza por una población de aproximadamente 5 millones de habitantes. Actividades como la pesca, el turismo, la agricultura intensiva y la minería, constituyen una fuerte amenaza para la biodiversidad de la ecorregión, que incluye hábitats como manglares, marismas, piscinas intermareales, pantanos, lagunas interiores (de agua dulce y salobres) donde existe una cadena alimenticia rica y compleja (Páez-Osuna, 2001; Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Con el auge de la acuicultura del camarón, su sistema de producción evolucionó de extensivo a semi-intensivo e intensivo muy rápidamente (con insumos crecientes de ingredientes para dietas, suministro de agua de alta calidad y aumento de desechos). Los actuales métodos de cultivo de camarón dan como resultado la descarga de cantidades considerables de nutrientes en los sistemas acuáticos adyacentes ya que los efluentes de los estanques de acuicultura generalmente están enriquecidos en sólidos orgánicos suspendidos, carbono, nitrógeno y fósforo, que pueden contribuir a la elevación de la concentración de nutrientes en los ambientes costeros, y suele tener efectos como: la acumulación de sedimentos

anóxicos, cambios en las comunidades biológicas bentónicas y la eutrofización de las aguas costeras (Tabla 1; Kautsky *et al.*, 2000; Tilley *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2003; Jayanthi *et al.*, 2018).

La presencia de estos contaminantes en los efluentes de acuicultura se debe principalmente a las excreciones inorgánicas de los organismos en cultivo, así como los residuos no consumidos de las dietas, los cuales son ricos en compuestos como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y algunos pigmentos (Figura 1; Naylor *et al.*, 2002). Algunos informes sobre el balance de masas de los nutrientes incluidos en las dietas revelan que, del total de nitrógeno y fósforo que entra con el alimento al sistema de cultivo, sólo es asimilado un sexto de estos en la biomasa de los organismos lo que representa una pérdida de nutrientes económicamente costosos y reduce la rentabilidad de la industria (Jackson *et al.*, 2003; Thakur y Lin, 2003).

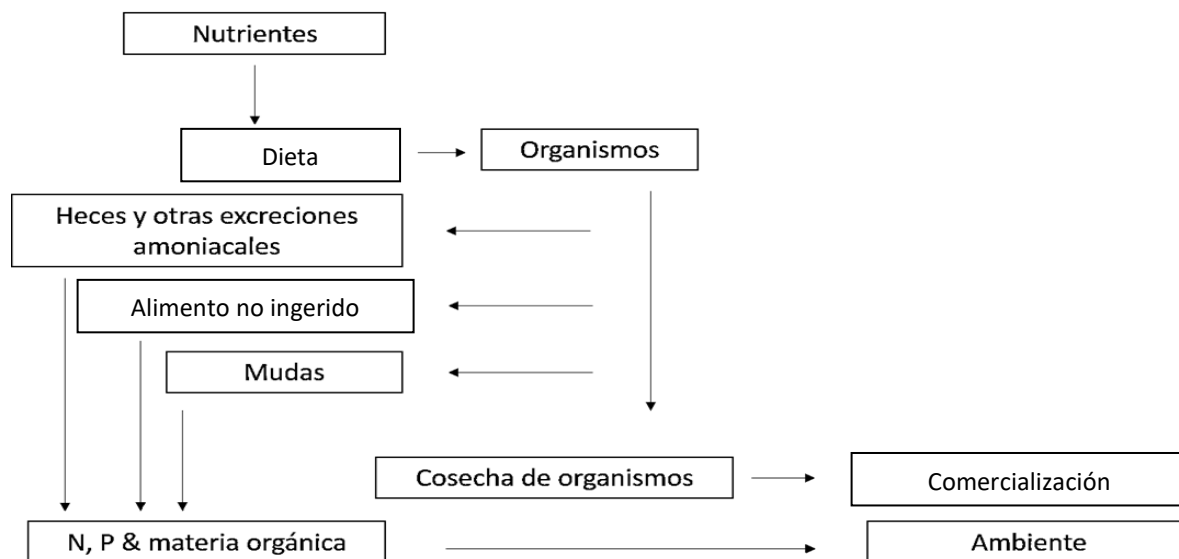


Figura 1. Representación esquemática de la relación entre la acuicultura y el medio ambiente. Modificado de Herath y Satoh (2015).

Como una problemática adicional, se ha identificado la presencia de productos químicos como: antibióticos, medicamentos o plaguicidas en los efluentes de los sistemas acuícolas. Estas sustancias hoy en día son conocidas como “contaminantes emergentes” o “compuestos farmacéuticamente activos”, los cuales



han cobrado gran importancia debido a su capacidad para inducir diferentes efectos biológicos en la biota marina incluso a concentraciones muy bajas (Asif, *et al.*, 2018).

Dado que, el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en el fitoplancton depende de la especie de microalgas y factores ambientales, se suele modificar la composición y abundancia del fitoplancton en los estanques de cultivo. Se tiene registro de que las diatomeas mejoran el crecimiento de los organismos en cultivo, por lo que la mayoría de las de granjas camaroneras prefieren una alta proporción de estas en sus comunidades fitoplanctónicas (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003).

Se han considerado alternativas como cultivos multitróficos o el uso de los efluentes de los estanques para irrigar hortalizas halotolerantes con el objetivo de mitigar el impacto de las actividades acuícolas en la calidad del agua de las aguas costeras (Páez-Osuna, 2001; Chopin *et al.*, 2012).

Tabla 1. Calidad del agua de diferentes efluentes de estanques de camaronicultura

DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	Nitrógeno total (mg/L)	Amonio (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	N/P	Referencia
-	0.2-7.4	0.1-8.6	-	-	-	0.06-0.31	1.1-61	Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003
-	0.4-33.9	0.5-20.9	-	-	-	0.2-0.69	5.5-67	
1555 ± 97	3650 ± 119	146 ± 16	76 ± 1	31 ± 6	46 ± 9	-	-	Boopathy, 2009
-	-	2.1	-	-	-	0.22	-	Jackson <i>et al.</i> , 2004
-	-	2.2	-	-	-	0.28	-	
-	-	3.1	-	-	-	0.25	-	
-	2.95 ± 0.177		1.36 ± 0.088	0.67 ± 0.041	0.41 ± 0.033	0.51 ± 0.022	-	Samocho <i>et al.</i> , 2004
-	3.56 ± 0.273		1.14 ± 0.082	0.45 ± 0.026	0.23 ± 0.021	0.45 ± 0.019	-	
1593 ± 26	-	597 ± 19.5	249.7 ± 6.1	181.3 ± 1.4	166 ± 22.7	-	-	Kern y Boopathy, 2012
-	-	-	103.7 ± 6.1	168.3 ± 1.4	176 ± 22.7	-	-	
0-88	0.22 -10.55	3-13	0.04 -0.70	0.168 -0.410	4.5 -18.2	0.29 -1.61	-	McIntosh y Fitzsimmons, 2003
-	-	-	443	28.7	28.7	5.8	-	Malibari <i>et al.</i> , 2018
-	-	-	6.12 ± 0.01	3.47 ± 0.02	3.80 ± 0.03	7.20 ± 0.03	-	Khatoon <i>et al.</i> , 2016
270	-	-	30	45	10	17	-	Sacristán de Alva <i>et al.</i> , 2018

DQO: Demanda química de oxígeno, DBO: Demanda bioquímica de oxígeno.

## 1.2 Biotecnología de microalgas

Las microalgas constituyen un grupo polifilético de organismos (procariontes y eucariontes) de gran importancia ecológica, que en conjunto generan el 50% de la producción primaria global y muchas especies son una fuente de productos de alto valor comercial, tanto de uso cotidiano (nutracéuticos, biocombustibles) como especializado (carotenoides, ácidos grasos, proteínas, antioxidantes y pigmentos), por lo que hoy en día existen un gran número de grupos de investigación en el uso de microalgas para aplicaciones biotecnológicas (Figura 2; León-Bañares *et al.*, 2004, Gangl *et al.*, 2015).

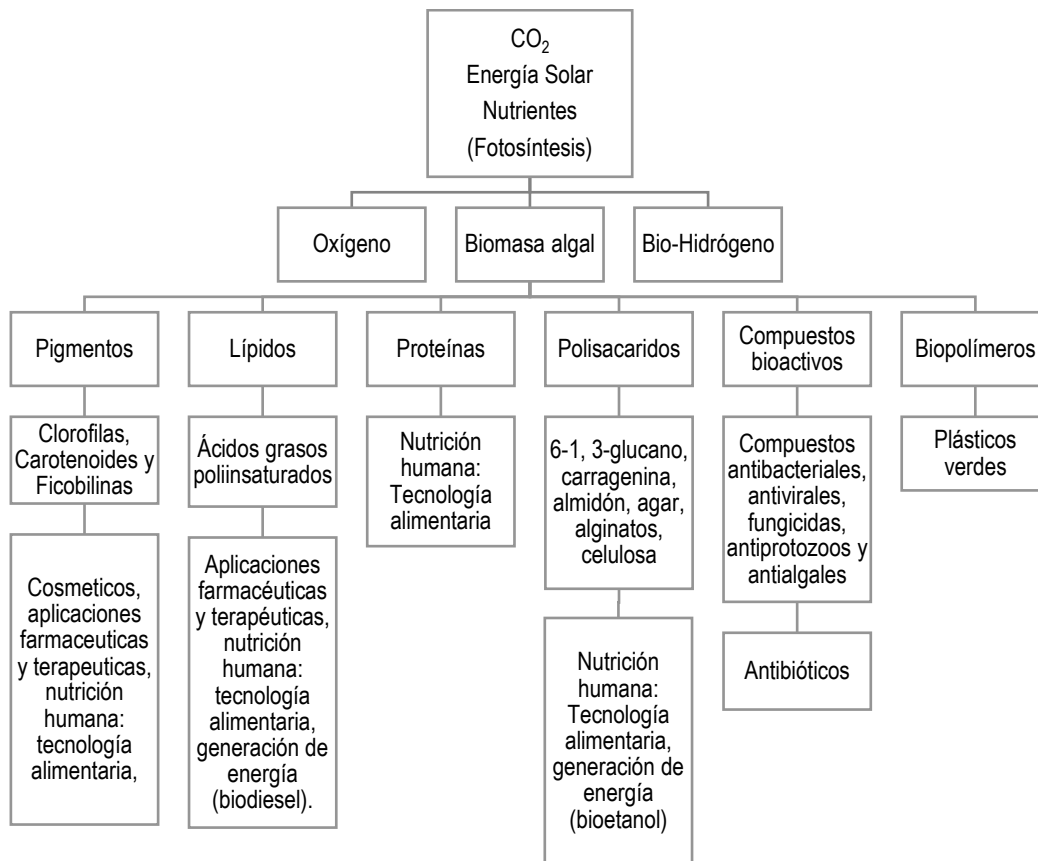


Figura 2. Productos que pueden sintetizados por cepas de microalgas y áreas de aplicación. Modificado de Koller *et al.* (2014).

Los precios para los productos obtenidos a partir de biomasa algal suelen fluctuar dependiendo del área donde se encuentra el sitio de producción, la situación de sus mercados y la pureza del producto. Debe tenerse en cuenta que los productos de

algas con los valores de mercado más altos se producen normalmente en cantidades que no exceden un pequeño porcentaje de la biomasa total (Koller *et al.*, 2014).

Diferentes sistemas de cultivo tales los como canales abiertos o los fotobiorreactores cerrados son utilizados para el cultivo comercial de algas (Figura 3). Sin embargo, la evaluación de co-cultivos de microalgas para la producción de biomasa microalgal no ha recibido gran atención por parte de la comunidad científica (Zhu *et al.*, 2013).

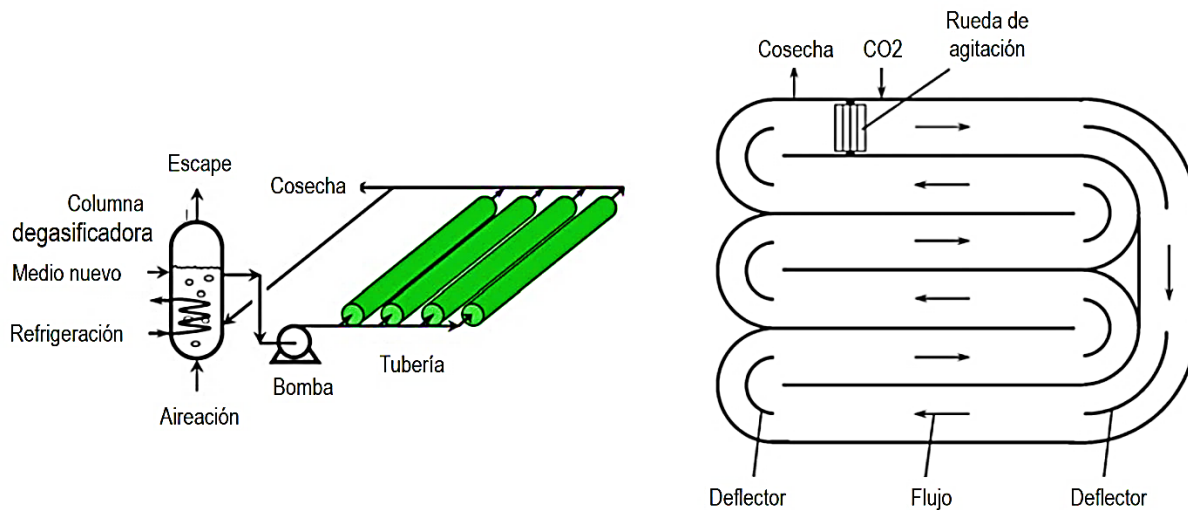


Figura 3. Ejemplos de reactores de cultivo. Modificado de Chisti (2007).

Los lípidos son uno de los componentes de mayor valor comercial que se pueden producir a partir de microalgas (Gangl *et al.*, 2015). Se sabe que el contenido de lípidos varía entre 1 y 70% del peso seco, aunque es posible inducir la acumulación de lípidos modificando las condiciones de cultivo, ya que bajo condiciones óptimas de crecimiento algunas especies pueden alcanzar hasta un 90% de lípidos a partir de su peso seco (Mata *et al.*, 2009).

Los lípidos producidos por microalgas pueden dividirse básicamente en dos tipos: los lípidos neutros (por ejemplo, triglicéridos, colesterol) y lípidos polares (como los fosfolípidos, galactolípidos; Huang *et al.*, 2009). Estos compuestos se pueden convertir en combustibles con propiedades similares a las de la gasolina mediante la transesterificación alcalina (estandarizada con alcoholes como el metanol), con la cual además se obtiene glicerol como principal subproducto del proceso, que

puede ser digerido anaeróbicamente para producir biogás que puede ser convertido a energía térmica por combustión o comercializado para fabricar productos cosméticos (Koller *et al.*, 2014).

Aunado a lo anterior, la productividad por área de las microalgas es mucho más alta que en la mayoría de los cultivos terrestres, lo que hace de las microalgas una fuente potencial para la obtención de lípidos (Chisti, 2007). Sin embargo, hasta la fecha, la producción de lípidos a partir de microalgas es considerada poco viable puesto que, con los métodos de cultivo existentes, los productos tienen un alto costo, debido principalmente a las elevadas inversiones de capital necesarias para alcanzar niveles de producción a escala industrial (Nascimento *et al.*, 2013; Smith y Crews, 2014; Chokshi *et al.*, 2017).

La tecnología necesaria para poder producir lípidos a partir de microalgas de manera rentable se encuentra todavía en varias fases de desarrollo y no ha sido suficientemente valorada a una escala industrial por lo que se considera que la investigación al respecto, hasta la fecha es relativamente joven y dispersa. De igual manera para probar la viabilidad del potencial industrial de estas tecnologías, es necesaria más información sobre la economía del proceso, por ejemplo, costos optimizados de los diferentes insumos y valor de mercado. Así como la posible obtención de otros productos de valor agregado que se puedan obtener al mismo tiempo (Sahay y Braganza, 2016).

En consecuencia de lo anterior, se requieren mayores esfuerzos de prospección biológica para mejorar los rendimientos de los cultivos, con investigaciones sobre la mejora en la eficiencia, fiabilidad y estabilidad del proceso de cultivo de biomasa de algal que permitan aprovechar al máximo el potencial de las microalgas (Smith y Crews, 2014).

Se han propuesto diversas estrategias, como el estrés por nutrientes, el uso de diferentes fuentes de carbono o distintas intensidades la luz para aumentar el contenido de lípidos intracelulares en las microalgas. Entre ellas, la inducción de estrés por nitrógeno ha resultado ser la más efectiva para acumular grandes concentraciones de lípidos en forma de triacilglicerol (TAG; Qiao-Hui *et al.*, 2015).

Los TAG's en las microalgas, funcionan como sustancias de almacenamiento de energía, carbono y sumidero de electrones cuando el suministro de electrones proporcionado por la fotosíntesis excede los requerimientos de metabólicos (Breuer *et al.*, 2012).

El procedimiento de estrés por nitrógeno es bien conocido por activar la acumulación de TAG's en detrimento de la división celular: este proceso tiene tres efectos metabólicos principales: disminución en la membrana del tilacoide, estimulación de la hidrólisis de fosfolípidos y activación de la acil-hidrolasa, cambios que bioquímicamente promueven un aumento del contenido de ácidos grasos intracelulares (Figura 4; Qiao-Hui *et al.*, 2015; Sacristán de Alva *et al.*, 2018).

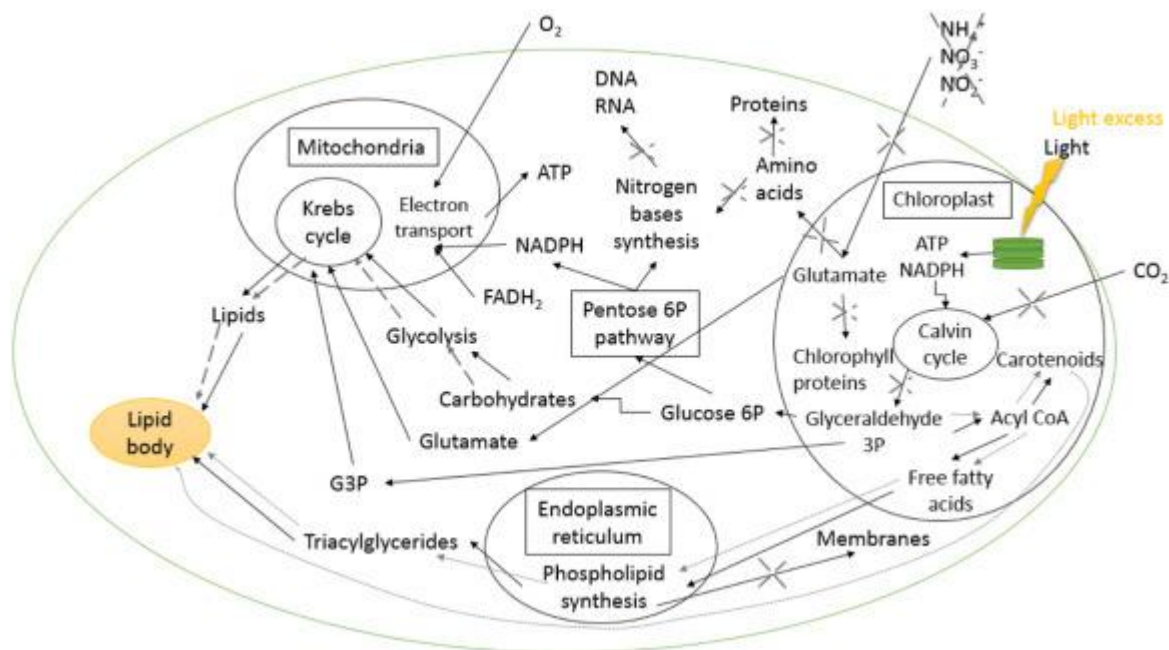


Figura 4. Esquema de la acumulación de lípidos promovida por la deficiencia de nitrógeno. Durante la limitación de nitrógeno, las vías marcadas con flechas discontinuas son utilizadas para la producción de lípidos. Las rutas indicadas con X se inhiben debido al efecto de una reducción en la tasa fotosintética, la cual disminuye la fijación de carbono a través de la fotosíntesis, así como la síntesis de proteínas. Tomado de Sacristán de Alva *et al.* (2018).

También se ha registrado que el estrés por nitrógeno induce el aumento de las enzimas glucolíticas del ciclo del ácido tricarbóxico para la biosíntesis *de novo* de los triacilgliceroles, mediante la disminución de los galactolípidos del cloroplasto y la reorganización del aparato fotosintético (Lauritano *et al.* 2019)

El estrés por nitrógeno puede ser conducido en los cultivos de dos formas: de manera repentina o progresivamente. El método repentino radica en realizar una cosecha de las microalgas para luego resuspenderlas en un medio libre de nitrógeno, mientras que la modalidad progresiva consiste en la inoculación de las microalgas en un medio con contenido limitado de nitrógeno, dejando que el consumo de nitrógeno durante el crecimiento del cultivo conduzca gradualmente a la disminución de este (Van Vooren *et al.*, 2012, Sacristán de Alva *et al.*, 2018).

En la práctica a gran escala el método progresivo parece ser el más adecuado, ya que la implementación de la modalidad repentina implicaría un aumento en la demanda energética del proceso, dada la necesidad de realizar una cosecha y cultivo adicionales (Van Vooren *et al.*, 2012).

Uno de los principales problemas de la producción de microalgas, es la formulación, preparación y selección de un medio de cultivo que sea económicamente rentable para la obtención de altas concentraciones de biomasa algal. La selección de cepas algales y el tipo de cultivo utilizado de igual manera son aspectos que determinan el costo de producción de la biomasa (Gómez *et al.*, 2011), por lo cual la viabilidad económica de la producción de algas depende también en gran porcentaje de la selección de cepas adecuadas (Nascimento *et al.*, 2013).

La identificación de cepas de microalgas con características como: alto rendimiento de producción, resistencia a la contaminación y tolerancia a una amplia gama de parámetros ambientales, es necesaria para respaldar el éxito de la manufactura a gran escala de productos a partir de microalgas, por lo que puede considerarse a la bioprospección, una actividad de investigación emergente en muchos países (Nascimento *et al.*, 2013).

### **1.3 Co-cultivos**

La economía en la producción a escala comercial actualmente favorece el cultivo de biomasa de algas en canales al aire libre debido a los costos considerablemente más altos de utilizar fotobiorreactores cerrados, sin embargo tales industrias hacen uso de monocultivos, los cuales, mantienen una sola especie de microalga durante

largos períodos de tiempo, por lo que crean un “estado ecológico artificial” similar al de un campo agrícola y requieren de mantenimiento constante para excluir a la comunidad circundante, lo que a su vez implica el uso de herbicidas, pesticidas y otros esfuerzos de exclusión los cuales son costosos y pueden representar un riesgo para el medio ambiente (Newby *et al.*, 2016; Luo, Le-Clech y Henderson, 2017).

En contraste a lo anterior, las algas en los ecosistemas naturales existen en conjuntos de múltiples especies, donde la abundancia de los organismos fluctúa a medida que cambian las condiciones ambientales. Tales cambios están impulsados por la heterogeneidad espacial y temporal de recursos tales como la disponibilidad de luz o nutrientes, los cuales que pueden cambiar rápidamente con el tiempo y con la profundidad en la columna de agua, creando nichos múltiples para especies con diferentes requerimientos de luz o nutrientes (Luo, Le-Clech y Henderson, 2017).

Existen pruebas sólidas que respaldan la idea de que la diversidad de especies promueve una alta productividad de los ecosistemas, así como la idea de que algunas (pero no todas) las combinaciones de especies cultivadas juntas en un área definida comúnmente sobrepasan las tasas de producción (del inglés “*overyielding*”) de cuando son cultivadas en sistemas de una sola especie, ya que se espera que las comunidades que tienen alta riqueza de especies utilicen mejor los recursos disponibles debido a la complementariedad de nicho, puesto que tienen una mayor probabilidad de exhibir interacciones interespecíficas positivas que desencadenen un efecto sinérgico, además de que es más probable que contengan especies altamente productivas que puedan dominar la comunidad (Newby *et al.*, 2016).

De igual forma, el principio de producción competitiva afirma que si dos especies (por ejemplo, A y B) tienen requisitos de recursos diferentes pero complementarios, estas pueden coexistir en el mismo hábitat, lo que da como resultado que la biomasa sumada de las especies A y B cultivadas juntas en co-cultivo debería exceder las productividades individuales de los monocultivos correspondientes de A y B. Además, la inestabilidad ecológica y evolutiva de los monocultivos sugiere que será



muy difícil o imposible mantener comunidades de estanques de especies únicas a largo plazo (Shurin *et al.*, 2013; Newby *et al.*, 2016).

La riqueza de especies no necesariamente aumenta la estabilidad de un sistema si las especies son funcionalmente equivalentes o responden al medio ambiente de manera común, es decir, las especies deben responder de manera diferente a las fluctuaciones ambientales o interactuar de manera que provoquen que sus poblaciones varíen de forma asincrónica para que la diversidad mejore la estabilidad del ecosistema. Por lo que solo un subconjunto de combinaciones de especies muestra estas propiedades deseables y solo bajo contextos ambientales particulares. Por lo que identificar consorcios de especies con una productividad de biomasa consistente, así como con una composición bioquímica útil debe ser una prioridad de investigación (Kazamia, Aldridge y Smith, 2012; Newby *et al.*, 2016).

Hay algunos desafíos que acompañan al uso de co-cultivos de algas, entre estos existen la repetibilidad de los experimentos debido a la composición de las especies. Sin embargo, se ha demostrado que la calidad de la biomasa recolectada se mantiene relativamente constante durante largos periodos de tiempo, lo que ha incrementado el potencial del uso del co-cultivos para la producción de biomasa (Luo, Le-Clech y Henderson, 2017).

En ciertos casos como en el cultivo de algas en aguas residuales la implementación de co-cultivos es necesaria, puesto que las aguas residuales no se pueden esterilizar completamente de una manera práctica y rentable. Dado que, las comunidades presentes en este medio evolucionan naturalmente, la protección exitosa de los cultivos requiere el uso de conceptos teóricos y principios ecológicos. Asimismo, debido a la complementariedad de los recursos y la retención de otros nutrientes por los conjuntos de microalgas, la riqueza específica debería mejorar la capacidad de los biorreactores de estanques para eliminar los contaminantes de nutrientes de las aguas residuales (Newby *et al.*, 2016; Luo, Le-Clech y Henderson, 2017).

Los estudios sobre la producción de biomasa algal suelen realizarse con cultivos microalgales axénicos. Aunque se ha reportado que cultivos conjuntos de

microalgas (co-cultivos), presentan mejor rendimiento en comparación a los cultivos monoespecíficos en términos de supervivencia, producción de biomasa, así como la eliminación de nutrientes (Choudhary *et al.*, 2016), la producción de biomasa algal mediante co-cultivos es un tema que no ha sido estudiado debidamente. Dentro de esta línea de investigación se pueden mencionar los trabajos de Kroes (1971), De la Cruz (1985), Fox (2004), Gómez Rodríguez y Subero (2011).

Algunos estudios como el de Fox (2004) refieren que las microalgas en co-cultivo alcanzan un biovolumen menor que en el monocultivo, lo cual no ha sido demostrado consistentemente, sin embargo, se ha observado que algunas especies de microalgas al ser co-cultivadas tienen un mejor desempeño en términos de: producción total de biomasa, protección de los cultivos contra las pérdidas por depredadores o protección de los cultivos contra las pérdidas por enfermedades (Smith y Crews, 2014).

El uso de la diversidad como un enfoque operativo para intensificar el rendimiento en la bioenergía a escala industrial requiere un conocimiento predictivo mucho mayor de las combinaciones de especies y las condiciones ambientales que dan lugar a ensamblajes productivos, eficientes y robustos (Shurin *et al.*, 2013).

#### **1.4 Microalgas en el tratamiento de aguas residuales**

El término “aguas residuales” se refiere a aguas que después de haber sido utilizadas en actividades antropogénicas contienen altas concentraciones de contaminantes como: energía, materia orgánica/inorgánica (disuelta o particulada), sólidos, toxinas, entre otras cosas, por lo que presentan una pérdida en su calidad. Estas suelen ser vertidas en los cuerpos de agua cercanos a la zona donde son utilizadas, por lo que causan serios problemas ambientales. Debido a esto el saneamiento de las aguas residuales ha adquirido mayor importancia, ya que es necesario asegurar que su reincorporación a los sistemas acuáticos naturales no perjudique al medio ambiente y ni a la salud de la población (Sriram y Seenivasan, 2012; De La Peña *et al.*, 2013).

Los métodos de tratamiento de aguas residuales se pueden clasificar en tres categorías: físicos (como la sedimentación y flotación), químicos (como la decoloración y adsorción) y biológicos (por ejemplo, los pozos de estabilización y reactores biológicos rotatorios (Rawat *et al.*, 2011; Figura 5).

Los métodos físicos son aquellos en que se aplican fuerzas mecánicas para eliminar contaminantes, mientras que los procesos químicos actúan provocando algún tipo de modificación por medio de reacciones químicas que permiten separar los contaminantes del agua residual, estos tres tipos de saneamiento suelen usarse de forma conjunta. El proceso de tratamiento de aguas residuales suele dividirse en tres etapas: tratamiento primario, secundario y terciario.

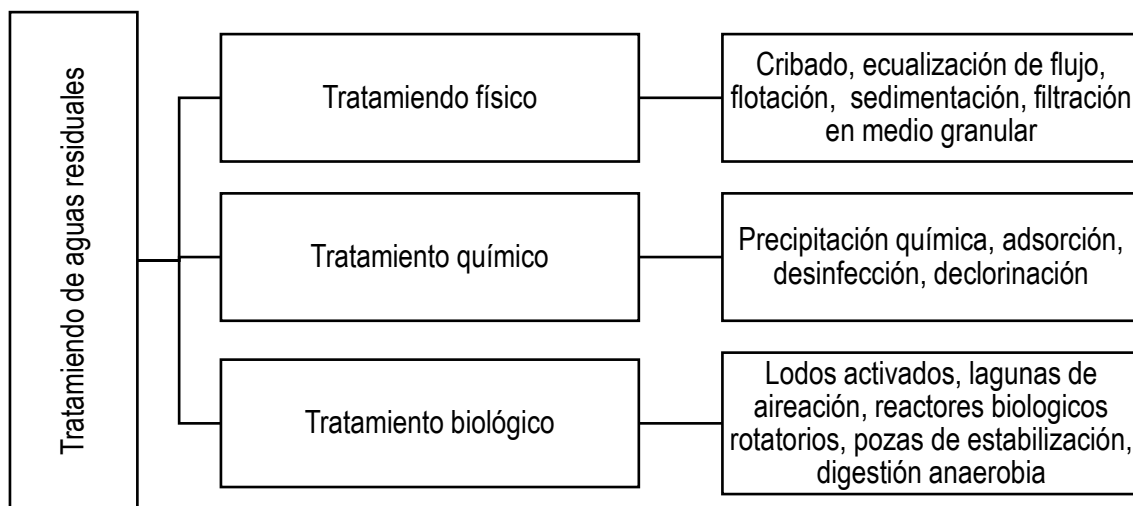


Figura 5. Procesos de tratamiento de aguas residuales. Tomado de Rawat *et al.* (2011).

El tratamiento primario consiste en la remoción por medios físicos o mecánicos de una parte sustancial del material sedimentable o flotante. Por otro lado, el tratamiento secundario reduce o convierte la materia orgánica (disuelta o particulada) en sólidos floculados que pueden ser separados por sedimentación en tanques de decantación. Finalmente el tratamiento terciario tiene como objetivo complementar los procesos anteriormente mencionados para lograr efluentes más puros, con menor carga contaminante (Rojas, 2002; Rawat *et al.*, 2011).

Se ha documentado que varias especies de microalgas pueden crecer en distintos tipos de aguas residuales, como: aguas residuales de escorrentía agrícola, acuicultura, así como efluentes industriales, de igual manera estas han demostrado ser eficientes en la remoción de contaminantes, al proceso de depuración de aguas residuales mediante microalgas se le conoce como “ficorremediación” (Choudhary *et al.*, 2016; Sriram y Seenivasan, 2012). La ficorremediación es un procedimiento que se ha aplicado durante casi 50 años, sobre el cual numerosos estudios refieren una alta eficiencia para la eliminación de nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo), bacterias coliformes, metales pesados, así como la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO; Figura 6), secuestro de CO<sub>2</sub> y la eliminación y/o degradación de compuestos xenobióticos (Shi *et al.*, 2007; Rawat *et al.*, 2016).

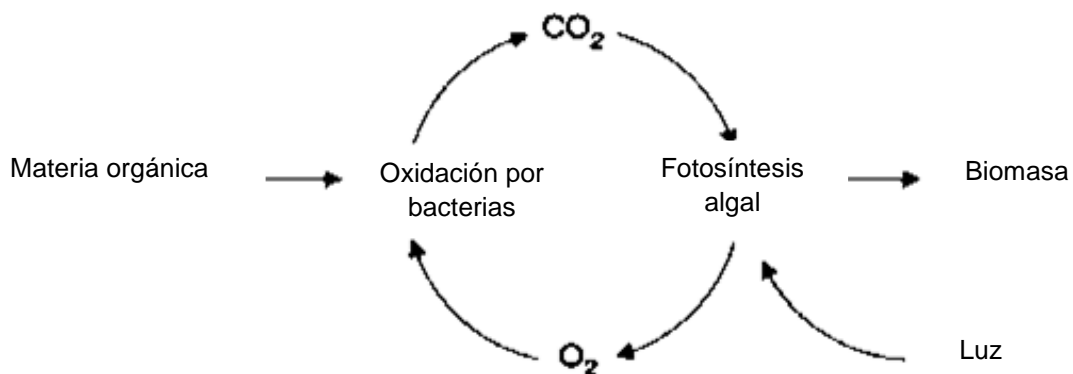


Figura 6. Oxigenación por fotosíntesis en el proceso de eliminación de DBO.

El proceso de eliminación de nutrientes está relacionado directamente con la capacidad de asimilación de las microalgas, las cuales toman estos elementos del agua y los utilizan como metabolitos de sus necesidades fisiológicas inmediatas o los almacenan para su utilización futura.

El nitrógeno es un macronutriente esencial para las microalgas, este es necesario para la síntesis de moléculas como péptidos, proteínas, ácidos ribonucleicos (ARN) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN). Las células microalgales asimilan el nitrógeno inorgánico presente en las aguas residuales (como amonio, nitrato o nitrito) y pueden convertirlo a las especies orgánicas de nitrógeno requeridas para el

anabolismo celular. De las tres fracciones químicas de nitrógeno inorgánico, las microalgas suelen seleccionar preferentemente al amonio sobre las restantes, debido a que puede convertirse sin ninguna reacción redox en el aminoácido glutamina, utilizando poca energía (Rawat *et al.*, 2016).

El fósforo presente en las aguas residuales puede encontrarse disuelto en el agua como fosfatos, ortofosfatos, polifosfatos o fosfato orgánico. Las microalgas tienen la capacidad de absorber fósforo (preferentemente ortofosfato) y utilizarlo para la síntesis de compuestos como: ácidos nucleicos, fosfolípidos o proteínas a través de la fosforilación. Este elemento es esencial para el proceso de transferencia de energía en el metabolismo, ya que forma parte del Adenosín Trifosfato (ATP) y Adenosín Difosfato (ADP). Una vez que el ortofosfato es absorbido por las microalgas estas pueden utilizarlo inmediatamente para la síntesis de moléculas orgánicas o almacenarlo como gránulos de polifosfato para usarlo cuando el fósforo externo este agotado o limitado (Rawat *et al.*, 2011).

Algunos procesos como la volatilización del nitrógeno amoniacal y la precipitación de los ortofosfatos juegan un papel muy importante en el proceso de depuración, ya que, estos pueden desencadenarse por un aumento en el pH como el provocado por la actividad fotosintética de las algas, por lo cual la proliferación de las microalgas puede controlar tanto directa como indirectamente la eliminación del nitrógeno y fósforo presentes en las aguas residuales (Olguín, 2003).

En los últimos años, la acuicultura intensiva ha tenido un auge en todo el planeta, con lo cual han surgido muchas preocupaciones ambientales concentradas principalmente en el tema de la eliminación de desechos, ya que se sabe que aproximadamente el 75% del nitrógeno y fósforo aplicado en los sistemas acuícolas no es aprovechado por los organismos de interés, por lo que termina en las aguas residuales que son vertidas en los sistemas acuáticos (Park *et al.*, 2015). Los impactos negativos de la acuicultura tienen que ver directamente con aspectos operacionales de las granjas, como la tasa de recambio de agua en los estanques, la duración y número de ciclos productivos, la densidad de la siembra, la

composición química de los efluentes, así como de las características de las aguas receptoras (Páez Osuna *et al.*, 2007).

Una de las alternativas para el tratamiento de aguas residuales de la acuicultura es la depuración con microalgas. Para el estudio del rendimiento del cultivo de microalgas en aguas residuales suelen utilizarse aguas residuales artificiales, ya que su uso es comparativamente más sencillo si el sitio de estudio se encuentra en zonas muy apartadas de las instalaciones del laboratorio. Las aguas residuales artificiales o sintéticas (ARS), se definen como un medio sintético, que contiene una composición de nutrientes inorgánicos similar a las aguas residuales reales (aunque carece de algunos componentes que están originalmente presentes en aguas residuales reales). Estas suelen utilizarse para analizar la capacidad de eliminación de nutrientes de las microalgas, la aclimatación de las células para de cultivos en aguas residuales reales y para identificar la concentración inhibidora del crecimiento de ciertos tipos de nutrientes (Sriram y Seenivasan, 2012; Van Den Hende *et al.*, 2014).

## II. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de microalgas para la generación de biomasa es un procedimiento bastante estudiado y desarrollado, sin embargo, durante el proceso se utilizan grandes cantidades de agua que deben ser enriquecidas con C, N y P, nutrientes que pueden ser encontrados en altas concentraciones en las aguas residuales, por lo cual estas aguas de desecho pueden potencialmente utilizarse como un medio de cultivo para microalgas, lo que funciona adicionalmente como un tratamiento ya que tales organismos mejoran la calidad fisicoquímica del agua.

Dado lo anterior, el cultivo de microalgas en aguas residuales presenta ventajas sobre el cultivo en aguas enriquecidas, ya que podría ayudar a disminuir los costos de producción de biomasa y a su vez funcionar como una herramienta de saneamiento para aguas residuales que generalmente son descargadas en los sistemas acuáticos naturales.

La mayor parte de los trabajos realizados en la línea de la ficorremediación hacen uso de cultivos monoespecíficos, aunque existe evidencia que sugiere que co-cultivos de estos organismos son más eficientes para la generación de biomasa y remoción de nutrientes, por lo que resulta interesante analizar cuáles son las diferencias entre los cultivos y co-cultivos incorporando el análisis hacia la producción de lípidos inducida mediante estrés por nitrógeno conducido de manera progresiva.

### **III. HIPOTESIS**

Si, empleando monocultivos microalgas se logra la remoción de nutrientes, generación de biomasa y acumulación de lípidos, empleando aguas que simulan un efluente de acuicultura, entonces es posible mejorar la respuesta a dichas variables mediante el uso de co-cultivo de varias especies.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar y comparar la remoción de nutrientes, generación de biomasa y lípidos de monocultivos y co-cultivos de microalgas realizados en agua que simula las condiciones de un agua residual de camaronicultura.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- a. Comparar la capacidad de remoción de nutrientes, generación de biomasa y acumulación de lípidos de tres especies de microalgas al ser cultivadas por separado y en conjunto.
- b. Evaluar al co-cultivo como una estrategia para optimizar el proceso de remoción de nutrientes y la producción de biomasa/lípidos de tres especies de microalgas.



## V. METODOLOGÍA

El presente proyecto se dividió en varias etapas, los datos obtenidos de en cada fase enriquecieron progresivamente la investigación.

### 5.1 Etapa 1

La primera etapa del proyecto se enfocó en la obtención y realización de cultivos de mantenimiento de las cepas microalgales utilizadas. De igual manera se realizó la adaptación de las microalgas al medio de cultivo experimental, el cual fue agua residual sintética (ARS) de los efluentes de un sistema de cultivo de camarón. La caracterización de las aguas residuales reales, así como la formulación del medio fue realizada por Sacristán de Alva *et al.* (2018; Tabla 2). Se efectuó el escalamiento de los cultivos previamente adaptados para la obtención de los inóculos necesarios para la siguiente etapa del proyecto (Figura 7).

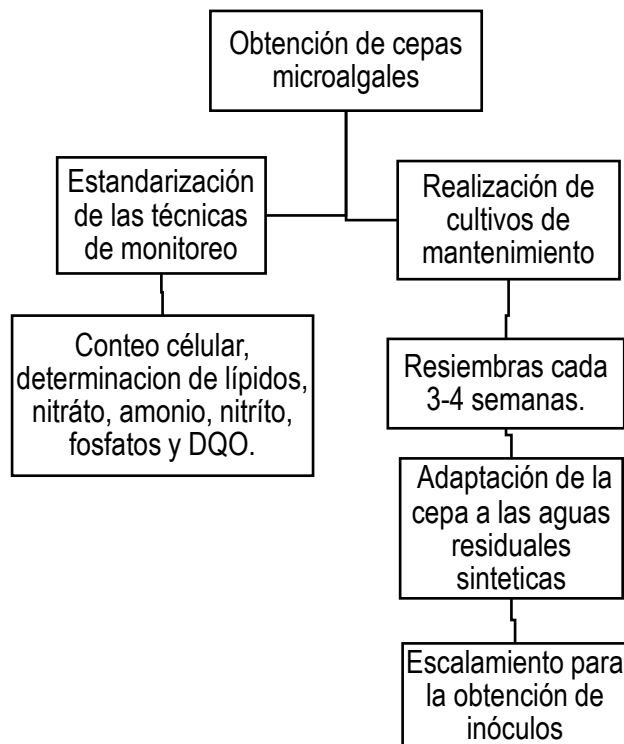


Figura 7. Esquema de la estrategia de trabajo de la primera parte del proyecto.

Se utilizaron tres especies de microalgas *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis chuii* (Figura 8), las cuales fueron seleccionadas por el alto porcentaje

de lípidos reportado en la bibliografía (Chisti, 2007; Loring *et al.*, 2013; Smith y Crews, 2014; Benvenuti *et al.*, 2015; Zhao, Qi y Chen, 2015). Estas fueron donadas por el Laboratorio de Producción de alimento vivo la UMDI Sisal UNAM.

Tabla 2. Composición de agua residual sintética de acuicultura de camarón (Sacristán de Alva, 2018).

15.6	mg/L $K_3PO_4$
7.5	mg/L $NaNO_2$
73.4	mg/L $KNO_3$
110.1	mg/L $[NH_4]_2SO_4$
370	mg/L $C_2H_3NaO_2$
31	mg/L sal marina formulada

Las algas fueron mantenidas en cultivos monoalgales no axénicos (por triplicado) en reactores (operados en discontinuo) con matraces Erlenmeyer de 250 mL adicionados con 200 mL de medio de mantenimiento (MM), el cual consistió en agua destilada llevada a 33 UPS con sal marina formulada marca *Instant Ocean* y enriquecida con 1 g/L de fertilizante hidrosoluble marca Peters (composición en Tabla 3) a pH 7.5, con resiembras periódicas cada 2-3 semanas (Marte-Virgen y Lora-Vilchis, 2017).

Tabla 3. Composición del Fertilizante Hidrosoluble Peters 20-20-20.

Nitrógeno total	20%
▪ Nitrógeno amoniacal	3.83%
▪ Nitrógeno de nitratos	6.07%
▪ Nitrógeno de urea	10.1%
Fosfato disponible ( $P_2O_5$ )	20%
Potasio soluble ( $K_2O$ )	20%
Magnesio	0.05%
Boro	0.0068%
Cobre	0.0036%
Hierro	0.05%
Manganeso	0.025%
Molibdeno	0.0009%
Zinc	0.0025%

Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura ambiental de 27 °C ±1 con aireación constante (filtrado con membranas de nitrocelulosa con apertura de malla 0.25 µm) y fotoperiodo de luz: oscuridad de 12h:12h, para la iluminación se utilizaron lámparas fluorescentes T8 marca Phillips de 32W, así como tiras LED de 127 V marca Geng Xin modelo 5050 (Figura 9).

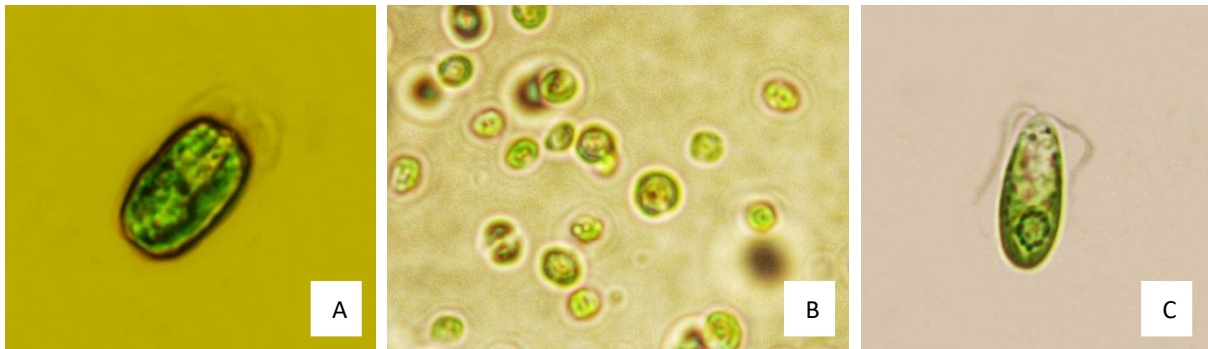


Figura 8. Microalgas utilizadas en el proyecto. A. *Tetraselmis chuii* B. *Nannochloropsis oculata* C. *Dunaliella* sp.

La adaptación de las algas al ARS se realizó cultivándolas en MM combinado en porcentajes ascendentes con la ARS, primero en proporción 1:10 ARS:MM y posteriormente en proporciones 2:8, 5:5, 7:3 hasta llegar a 10:0 (Sacristán de Alva *et al.*, 2013). El escalamiento de los cultivos se realizó en matraces Erlenmeyer de 1 L adicionados con 720 mL de ARS e inoculados con 80 mL de los cultivos de algas previamente acondicionadas (Marte-Virgen y Lora-Vilchis, 2017).

Una revisión en la literatura sobre la composición de química proximal de algunas microalgas del género *Tetraselmis* y *Dunaliella*, reporta que aproximadamente un 3.3% del peso seco de estos organismos corresponde a fósforo (Parsons *et al.*, 1961), dado lo anterior, considerando la composición del ARS (relación N:P = 12:1) y a este elemento como nutriente limitante (se considera que dentro del rango comprendido entre 10:1 - 20:1 tanto el N como P pueden ser limitantes), la productividad máxima de los reactores no debería exceder los 0.4 g/L de biomasa algal (Salusso y Moraña, 2014). Sin embargo, la literatura también refiere que existe una enorme plasticidad de la composición elemental del fitoplancton de muestras ambientales y en los cultivos de laboratorio.

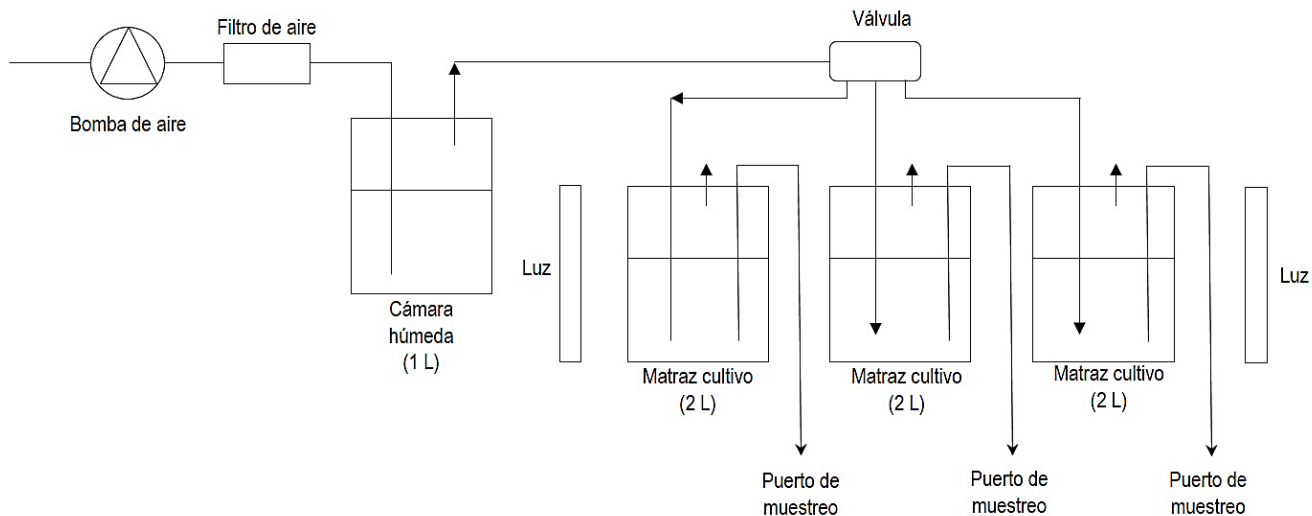


Figura 9. Esquema del cultivo por lotes utilizado para el cultivo de las cepas microalgales.

Para el monitoreo de los cultivos, se utilizaron técnicas colorimétricas específicamente diseñadas para agua marina (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas utilizadas en el monitoreo de los cultivos.

Prueba	Referencia
Nitratos <sup>a</sup>	Collos <i>et al.</i> (1999)
Nitritos <sup>a</sup>	Grasshoff <i>et al.</i> (1999)
Amonio <sup>a</sup>	Grasshoff <i>et al.</i> (1999)
Fosfatos <sup>a</sup>	Grasshoff <i>et al.</i> (1999)
Lípidos <sup>b</sup>	Mishra <i>et al.</i> (2014)
Densidad óptica <sup>b</sup>	Arredondo-Vega <i>et al.</i> (2017)
DQO <sup>a</sup>	Vyrides y Stuckey (2009)
Clorofila <sup>b</sup>	Becker (1994)

<sup>a</sup> Realizadas al ARS, <sup>b</sup> Aplicadas en la biomasa

Para el análisis de fosfatos totales (PO<sub>4</sub>) se utilizó un método colorimétrico basado, en la reacción de los iones PO<sub>4</sub> con un reactivo de molibdato acidificado para producir un heteropoliácido de fosfomolibdato, que luego se reduce a un compuesto azul, que puede ser cuantificado en un espectrofotómetro a 880 nm (Grasshoff *et al.*, 1999).

El método para la determinación de la concentración de nitritos (NO<sub>2</sub>), se basa en hacer reaccionar los iones nitritos con una amina aromática, lo que conduce a la formación de un compuesto de diazonio que posteriormente se acopla con una

segunda amina aromática, se usa hidrocloreuro de sulfanilamida como el compuesto amino, que después de la diazotización se acopla con N-(1-naftil) dihidrocloreuro de etilendiamina para formar un compuesto color rosado el cual es medido a 540 nm (Grasshoff *et al.*, 1999).

Para el monitoreo de los nitratos ( $\text{NO}_3$ ), se realizó mediante determinación directa por espectrofotometría a una absorbancia de 220 nm en celdas de cuarzo. El método tiene una precisión de 1.5% y la concentración de nitratos es lineal hasta 500  $\mu\text{M}$ . Este procedimiento tiene la ventaja de ser simple y rápido, además de no incluir el uso de metales pesados como el Cu o Va como agentes reductores, elementos que son muy tóxicos y por lo tanto poco adecuados para su uso rutinario (Collos *et al.* 1999; Arredondo-Vega *et al.* 2017).

Para la estimación del ion amonio ( $\text{NH}_4$ ) se siguió el método de azul de Indofenol, en el cual se hacen reaccionar a los iones de amonio con hipoclorito en una solución moderadamente alcalina, lo que da lugar a monocloramina que, en presencia de fenol, así como cantidades catalíticas de iones nitroprusiato y un leve exceso de hipoclorito da lugar al compuesto azul de indofenol, el cual se puede valorar espectrofotométricamente a 540 nm (Grasshoff *et al.*, 1999).

En la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO), se utilizó una modificación del método colorimétrico de reflujo cerrado estándar para el análisis de muestras que contienen alta salinidad (40 g de  $\text{NaCl L}^{-1}$ ). Este método precipita el exceso de iones cloruro del agua de mar usando de sales de  $\text{HgCl}_2$ , las muestras posteriormente son digeridas con una solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-HgSO}_4$  y 2.8 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata, para enseguida ser calentadas en un reactor de reflujo de DQO a  $150^\circ\text{C}$  durante 2 h. Pasado el tiempo los tubos de reacción se dejan enfriar durante 6 horas y son analizados a una longitud de onda de 600 nm (Vyrides y Stuckey, 2009).

El método para la determinación de lípidos implica el uso de un reactivo de fosfovainillina que se prepara utilizando ácido fosfórico y vainillina. A las muestras de interés se les agrega ácido sulfúrico concentrado y posteriormente son calentadas a  $100^\circ\text{C}$  con ayuda de un baño seco, una vez hecho esto se añade el

reactivo de fosfovainillina y enseguida los tubos de reacción son sometidos a un breve periodo de incubación a 37° C con agitación orbital a 200 rpm, finalmente es medida su absorbancia a 530 nm (Mishra *et al.*, 2014).

La densidad óptica de los cultivos se determinó como la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 680 nm, usando como blanco de calibración medio de cultivo esteril (Arredondo-Vega *et al.* 2017).

## 5.2 Etapa 2

Para la segunda fase del proyecto, la iluminación de la cámara de cultivo fue modificada por lo que las lámparas Phillips T8 de radiación PAR fueron sustituidas por tiras LED de luz blanca Geng Xin modelo 5050, las cuales permitieron homogeneizar la intensidad de radiación proporcionada a cada uno de los reactores (Figura 10).

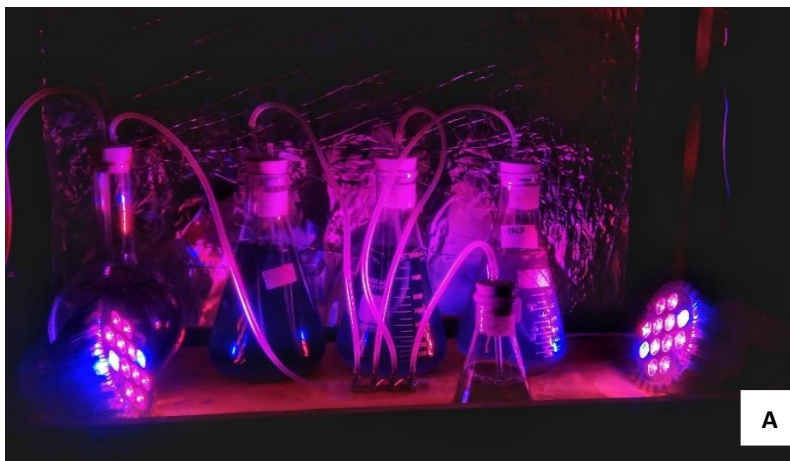


Figura 10. Acondicionamiento de la cámara de cultivo. A) Las lámparas PAR son funcionales, pero la intensidad de luz no es homogénea B) La iluminación LED permite brindar la misma radiación a todos los cultivos.



En esta etapa se realizaron cuatro lotes de cultivo de las cepas microalgales. Durante el primer lote cada alga fue cultivada monoespecíficamente, en el segundo lote las algas fueron co-cultivadas en pares, mientras que el tercer lote correspondió a un experimento control no inoculado (Figura 10).

Los inóculos de cada reactor fueron preparados centrifugando 300 mL de los cultivos de microalgas previamente escalados a 7000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 50 mL de ARS los cuales fueron agregados en cada uno de los reactores ya adicionados con 1.5 litros de ARS dando un volumen final de 1.55 L. Los cultivos experimentales fueron mantenidos con aireación constante a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  con un fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 a una intensidad de luz  $150\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para el monitoreo del ARS eran filtrados mediante una bomba de vacío 10 mL de medio de cada reactor, con membranas de celulosa Millipore (abertura de  $0.45 \mu\text{m}$ ) previamente pesadas. Estas membranas eran posteriormente secadas durante 24 horas a  $60^{\circ}\text{C}$  en una estufa Labnet 211DS y subsecuentemente pesadas para el registro del peso seco de la biomasa (Figura 11, Sacristán De Alva *et al.*, 2018).

Por otro lado, las algas fueron sometidas a un proceso de estrés por nitrógeno conducido de manera progresiva, es decir permitiendo que el consumo de este elemento durante el crecimiento del cultivo llevara a la disminución de su concentración hasta que esta fuera lo suficientemente baja para inducir acumulación de lípidos en las células (Van Vooren *et al.*, 2012; Sacristán De Alva, 2013).

Los parámetros poblacionales de tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), productividad de lípidos y productividad de biomasa fueron calculados siguiendo la propuesta de Toledo-Cervantes *et al.* (2013).

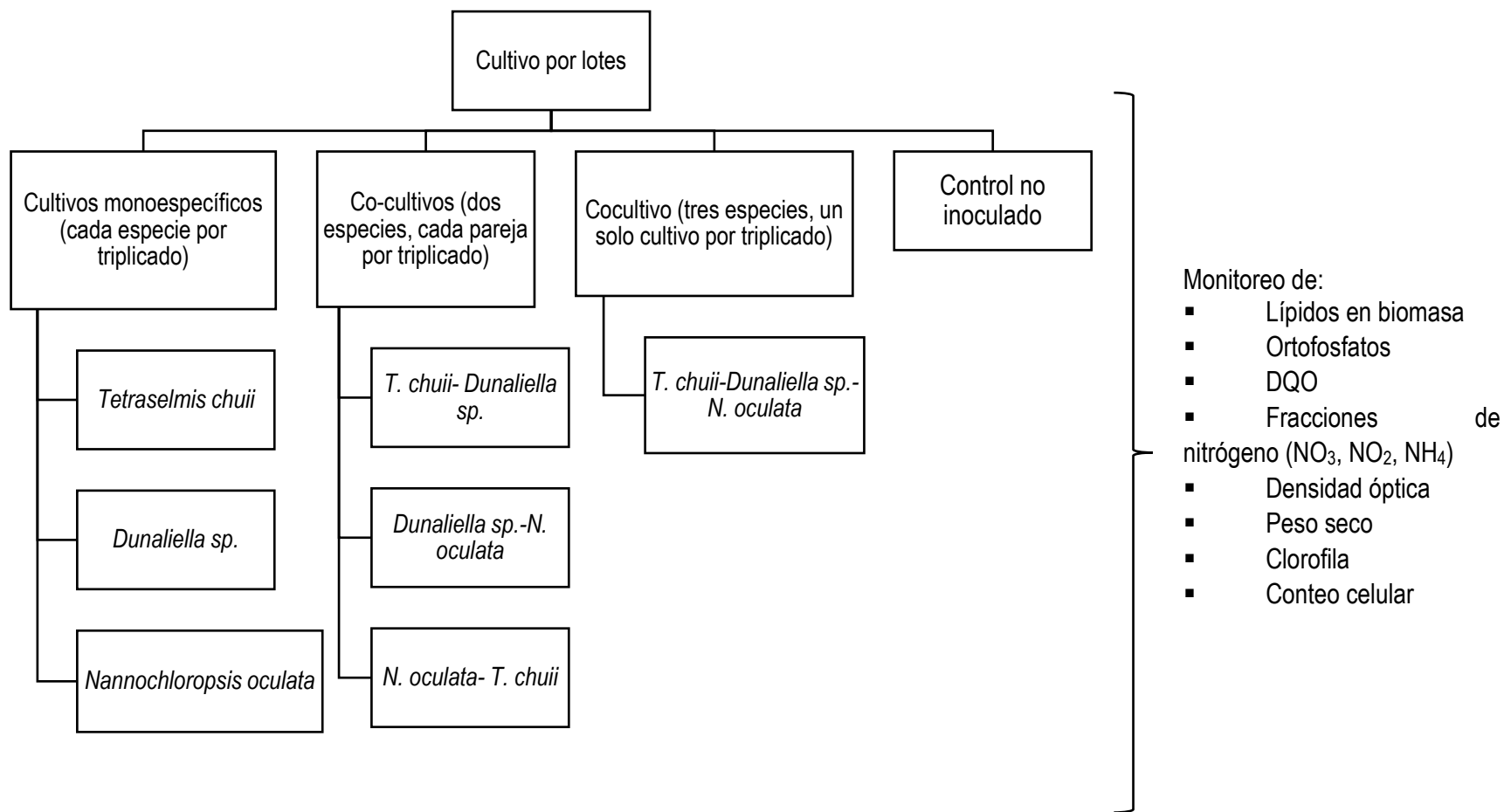


Figura 11. Esquema de trabajo de la segunda etapa del proyecto.



### **5.3 Análisis estadístico**

Se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones finales del monitoreo de cada parámetro en cada cultivo. Para ello se realizaron pruebas ANOVA con análisis Post Hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). Asimismo, se comparó el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos medidos a lo largo del experimento mediante un análisis de covarianza ANCOVA, esto usando las especies en cultivo como variable de agrupamiento.

Para todos los análisis se consideró un alfa de 0.05 y fueron realizados en el software estadístico R Studio.

Los procedimientos realizados para el análisis de los datos se explican de manera detallada en la sección Análisis y Discusión.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Control

En las tablas 5-12 se muestran los resultados del experimento control no inoculado. La Tabla 5 y Figura 12d contienen los datos obtenidos del monitoreo de ortofosfatos, este parámetro tuvo una concentración final 12.6% menor a la inicial.

**Tabla 5.** Concentración de ortofosfatos en el cultivo control.

días	Ortofosfatos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	14.8	14.6	14.2	14.6	0.3
5	13.6	13.7	13.8	13.7	0.1
8	13.7	13.9	13.5	13.7	0.2
10	13.5	13.8	13.9	13.7	0.2
12	13.7	13.5	13.7	13.6	0.1
15	13.7	13.6	13.6	13.6	0.0

La Tabla 6 y Figura 12a muestran los resultados del monitoreo de NH<sub>4</sub>, este parámetro tuvo una concentración final promedio 6.2% menor a la inicial, podemos observar como las como las concentraciones de este compuesto fueron oscilantes durante todo el experimento.

**Tabla 6.** Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo control.

Días	Nitrógeno amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	105.0	102.3	107.6	105.0	2.7
5	102.3	102.3	110.9	105.2	5.0
8	99.6	107.6	91.6	99.6	8.0
10	105.0	102.3	94.3	100.5	5.6
12	102.3	107.6	99.6	103.2	4.1
15	105.0	96.9	107.6	103.2	5.6

La Tabla 7 y Figura 12c muestra las concentraciones del monitoreo de NO<sub>2</sub>. Este parámetro registró una concentración final promedio 10.6% menor a la inicial, sin embargo, durante el octavo día de cultivo se registró una concentración mínima

promedio que fue 17.3% menor a la inicial, a partir de este día las concentraciones tuvieron un leve aumento hasta el final del experimento.

Tabla 7. Concentración de nitritos en el en el cultivo control.

<b>Nitritos (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
<b>3</b>	6.5	6.5	6.3	6.4	0.1
<b>5</b>	6.3	6.4	6.5	6.4	0.1
<b>8</b>	6.3	6.4	6.2	6.3	0.1
<b>10</b>	6.2	6.5	6.5	6.4	0.2
<b>12</b>	6.7	6.7	6.7	6.7	0.0
<b>15</b>	6.9	6.9	6.9	6.8	0.1

La Tabla 8 y Figura 12b, muestran los resultados del monitoreo de NO<sub>3</sub>, las concentraciones de este compuesto se mantuvieron entre 72.6 y 71.4 mg L<sup>-1</sup> con una concentración final promedio 2.7% menor a la inicial.

Tabla 8. Concentración de nitratos en el cultivo control.

<b>Nitratos (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
<b>3</b>	72.6	73.0	72.2	72.6	0.4
<b>5</b>	71.5	72.5	72.2	72.0	0.5
<b>8</b>	71.5	72.5	72.5	72.2	0.6
<b>10</b>	72.5	71.5	72.5	72.2	0.6
<b>12</b>	72.1	71.5	72.1	71.9	0.4
<b>15</b>	72.1	71.6	70.6	71.4	0.8

La Tabla 9 y Figura 13d muestran los resultados del monitoreo de lípidos del experimento control. Las concentraciones en biomasa de estos compuestos se mantuvieron por debajo del límite de detección de la técnica durante los 15 días de cultivo, es necesario mencionar que el límite inferior la curva de calibración del protocolo es 0 mg L<sup>-1</sup>.

Tabla 9. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo control.

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
3	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
5	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
8	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
10	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
12	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

Los datos del monitoreo de la densidad óptica de los cultivos control se muestran en la Tabla 10 y Figura 13a. Las absorbancias del medio de cultivo registradas durante el experimento se mantuvieron entre 0.005 y 0.007, valores que pueden considerarse como bajos si se comparan con los registrados durante el resto de los experimentos.

Tabla 10. Densidad óptica del cultivo control.

Días	Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	0.001	0.008	0.005	0.005	0.004
2	0.005	0.007	0.008	0.007	0.002
3	0.001	0.007	0.004	0.004	0.003
4	0.006	0.003	0.004	0.004	0.002
8	0.006	0.009	0.007	0.007	0.002
10	0.004	0.008	0.009	0.007	0.003
12	0.007	0.004	0.005	0.005	0.002
15	0.005	0.003	0.006	0.005	0.002

Las concentraciones de peso seco de la biomasa durante el experimento control se muestran en la Tabla 11 y Figura 13c. Dado que los experimentos control no fueron inoculados, los valores obtenidos para peso seco no pueden deberse a la presencia de biomasa algal y es probable que los pesos registrados se deban a las sales de nutrientes utilizadas para elaborar el medio de cultivo.

Tabla 11. Peso seco de la biomasa en el cultivo control.

<b>Peso seco (g L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>					
<b>3</b>	0.05	0.02	0.04	0.05	0.02
<b>5</b>	0.06	0.05	0.02	0.06	0.05
<b>8</b>	0.06	0.07	0.04	0.06	0.02
<b>10</b>	0.05	0.03	0.08	0.05	0.03
<b>12</b>	0.02	0.03	0.00	0.02	0.03
<b>15</b>	0.06	0.04	0.04	0.06	0.04

La Tabla 12 y Figura 13c muestran los datos resultantes del monitoreo de la demanda química de oxígeno del experimento control. Para este parámetro la concentración final promedio fue 5.1% menor a la inicial.

Tabla 12. Demanda química de oxígeno en el cultivo control.

<b>DQO (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
<b>3</b>	261.7	268.3	258.3	262.8	5.1
<b>5</b>	258.3	265.0	271.7	265.0	6.7
<b>8</b>	261.7	258.3	251.7	257.2	5.1
<b>10</b>	255.0	248.3	251.7	251.7	3.3
<b>12</b>	271.7	265.0	258.3	265.0	6.7
<b>15</b>	261.7	255.0	251.7	256.1	5.1

Hay que mencionar que todos los valores obtenidos durante el monitoreo del experimento control deben atribuirse a la variación causada por el método experimental.

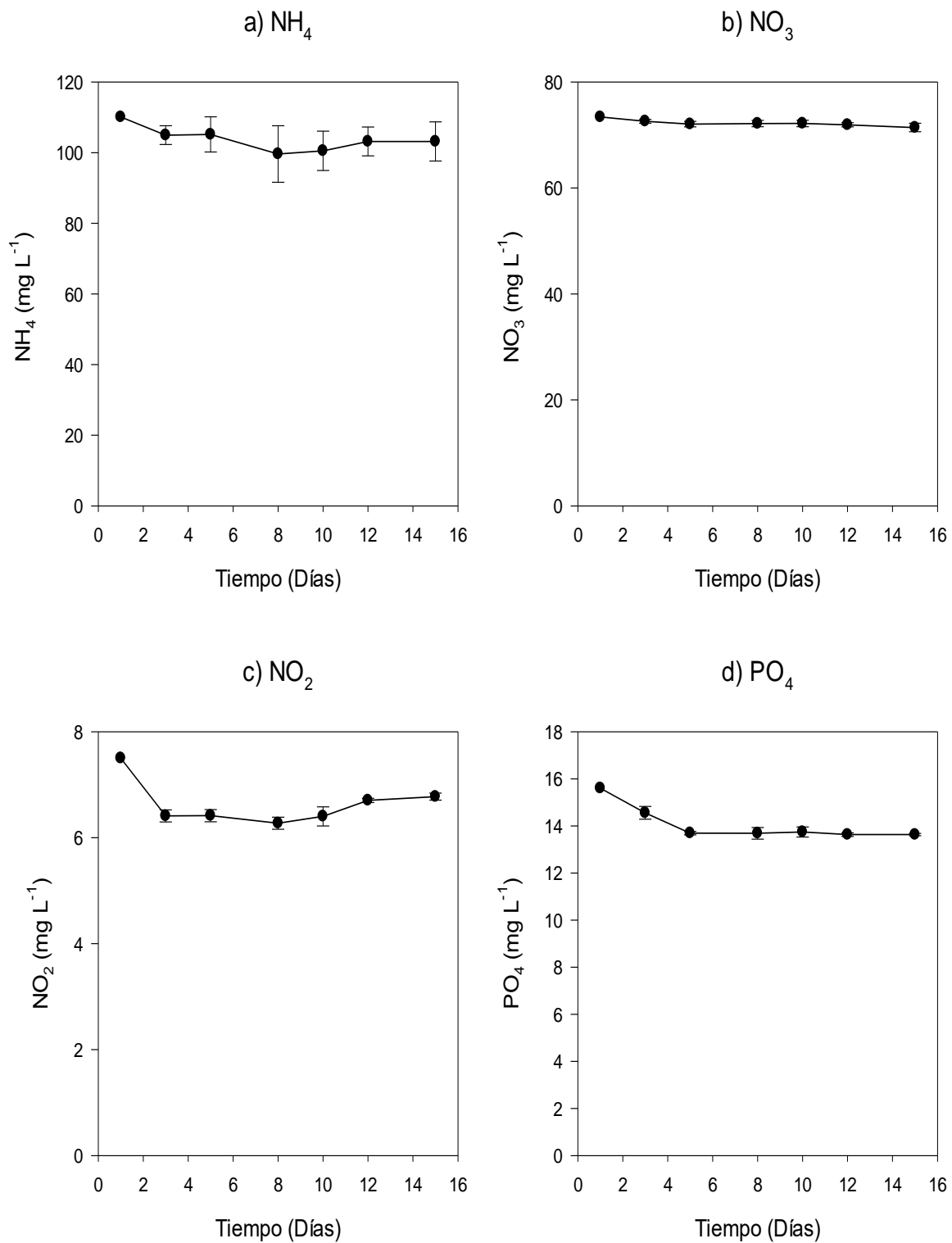


Figura 12. Perfil de remoción en los cultivos control. a) Amonio, b) Nitratos, c) Nitritos. D) Ortofosfatos.

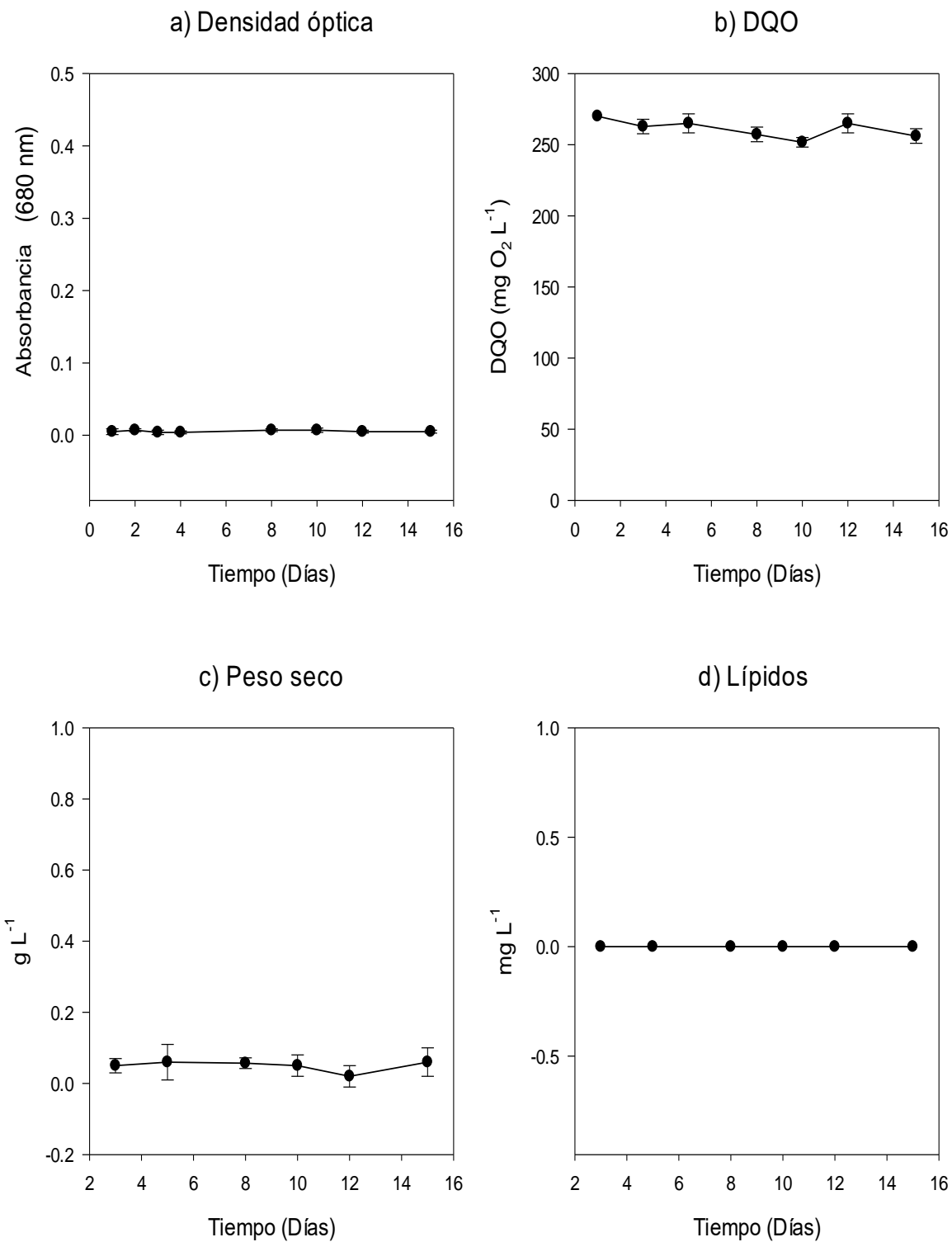


Figura 13. Perfil de remoción en los cultivos control. a) Densidad óptica, b) Demanda química de oxígeno, c) Peso seco, d) Lípidos.

## 6.2 Cultivo de *Dunaliella* sp.

Los resultados del cultivo de *Dunaliella* sp. se muestran en las tablas 13-20. En la Tabla 13 y Figura 14b podemos observar la concentración de ortofosfatos en el agua residual sintética durante los días de monitoreo.

El cultivo de esta microalga dio como resultado la remoción del 98.7% de los ortofosfatos con una cinética de remoción de  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Es necesario apreciar que a partir del día cinco de cultivo comenzaron a registrarse concentraciones bajas (a veces indetectables) de este compuesto, las cuales se mantuvieron por debajo de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  hasta el final del experimento.

Tabla 13. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.

Días	Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	1.8	1.9	2.0	1.9	0.1
5	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
8	0.6	DLD	0.4	0.5	0.2
10	0.1	DLD	0.0	0.1	0.1
12	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0
15	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0

DLD: Debajo del límite de detección.

En la Tabla 14 y Figura 14a se presentan los resultados del monitoreo de la concentración de nitrógeno amoniacal.

Tabla 14. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.

Días	Nitrógeno amoniacal ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	43.9	39.6	41.5	41.7	2.1
5	32.5	31.4	42.2	35.4	6.0
8	28.2	27.8	31.2	29.1	1.8
10	30.1	26.5	25.8	27.5	2.3
12	15.1	17.7	16.3	16.4	1.3
15	0.6	1.0	0.8	0.8	0.7

Este compuesto, registró una concentración final 99.3% menor a la inicial, con una cinética de remoción de  $7.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . El cultivo de *Dunaliella* sp. alcanzó



concentraciones bajas de  $\text{NH}_4$  hasta día 15 de monitoreo, pero es necesario resaltar que durante los primeros tres días de cultivo este tratamiento logró remover el 60.1% del  $\text{NH}_4$  con una cinética de remoción de  $22 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ , posteriormente la cinética de remoción disminuyó considerablemente y solo se removi6 el 33.1% restante en los consiguientes 12 días de cultivo.

La concentración final de nitritos (Tabla 15, Figura 14d) fue 25.7% menor a la inicial y no mostr6 una tendencia a disminuir, ya que las concentraciones registradas fluctuaron entre 4 y  $5 \text{ mg L}^{-1}$  durante los últimos siete días del cultivo, además durante el tercer día de cultivo se midieron concentraciones de  $\text{NO}_2$  mayores a la inicial.

Tabla 15. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.

Días	Nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
3	13.1	10.7	10.9	11.5	1.3
5	2.4	6.1	6.4	5.0	2.2
8	6.6	4.4	5.7	5.6	1.1
10	3.6	4.8	4.5	4.3	0.6
12	5.1	4.3	4.7	4.7	0.4
15	7.6	3.9	5.3	5.6	1.9

Los nitratos mostraron una tendencia a la baja durante el periodo de cultivo (Tabla 16, Figura 14c). Se registr6 una concentración final de  $\text{NO}_3$  98.4% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de  $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Para este compuesto podemos mencionar que entre los días tres y diez de cultivo las concentraciones se mantuvieron entre 35 y  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , periodo durante el cual la cinética de remoción fue muy baja. De igual forma podemos resaltar que durante el último día de monitoreo se encontraron concentraciones de  $\text{NO}_3$  por debajo del límite de detección.

Tabla 16. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	35.6	36.2	35.8	35.9	0.3
5	36.6	35.4	32.0	34.6	2.4
8	24.1	21.0	30.3	25.2	4.7
10	18.0	22.7	21.5	20.7	2.4
12	8.4	12.6	10.5	10.5	2.1
15	DLD	3.0	0.8	1.2	1.7

DLD: Debajo del límite de detección.

*Dunaliella* sp. (Tabla 17, Figura 14a) mostró una productividad de lípidos de 2.7 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> al final del cultivo. El periodo con mayor productividad se encontró entre los días 3-10 de cultivo con una productividad de 5.1 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, en este lapso se sintetizaron la mayor parte de los lípidos presentes en la biomasa. A partir del décimo día la concentración de estos compuestos en la biomasa tuvo un crecimiento muy bajo.

Tabla 17. Concentración de lípidos en la biomasa de *Dunaliella* sp.

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
3	68.7	58.2	43.1	56.6	12.9
5	71.7	35.5	48.5	51.9	18.3
8	59.5	59.8	83.5	67.6	13.8
10	94.9	70.3	112.4	92.5	21.1
12	97.0	73.8	121.6	97.5	23.9
15	86.2	79.5	127.8	97.8	26.1

Con el monitoreo de la densidad óptica de los cultivos (Tabla 18, Figura 15c), se logró documentar la cinética de crecimiento de las microalgas. Con estos datos se aprecia que *Dunaliella* sp. tuvo su fase de crecimiento logarítmico entre los días 1-7 de cultivo y la fase estacionaria se alcanzó aproximadamente al octavo día. Por otro lado, el día 15 puede apreciarse una disminución de la densidad óptica, lo que sugiere que las células en el cultivo comenzaban a entrar a su fase de muerte.

Tabla 18. Densidad óptica de los cultivos de *Dunaliella* sp.

<b>Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	0.118	0.089	0.121	0.109	0.018
<b>2</b>	0.380	0.376	0.429	0.395	0.030
<b>3</b>	0.456	0.413	0.506	0.458	0.047
<b>4</b>	0.439	0.458	0.525	0.474	0.045
<b>8</b>	0.580	0.571	0.625	0.592	0.029
<b>10</b>	0.570	0.665	0.679	0.638	0.059
<b>12</b>	0.562	0.699	0.746	0.669	0.096
<b>15</b>	0.469	0.702	0.694	0.622	0.132

En la Tabla 19 y Figura 15a se muestran los resultados del monitoreo de peso seco para *Dunaliella* sp. Esta especie tuvo una productividad de biomasa de  $19.44 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . La concentración más alta de biomasa se alcanzó al último día de monitoreo, ya que todos los reactores superaron  $1 \text{ g L}^{-1}$  de peso seco con un promedio de  $1.022 \text{ mg L}^{-1}$ . La tasa de crecimiento específico de estos cultivos fue  $0.031 \text{ Día}^{-1}$ .

Tabla 19. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Dunaliella* sp.

<b>Peso seco (g L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>					
<b>3</b>	0.862	0.736	0.768	0.789	0.068
<b>5</b>	0.876	0.866	0.856	0.866	0.010
<b>8</b>	0.926	0.896	0.943	0.922	0.025
<b>10</b>	0.961	0.956	1.016	0.979	0.032
<b>12</b>	0.906	1.036	0.926	0.956	0.070
<b>15</b>	1.076	1.046	0.945	1.022	0.068

La DQO, mostró una tasa de disminución promedio de  $14.93 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ , la DQO final fue 82.99% menor a la inicial. Podemos resaltar que se registró la DQO más baja al día 12 de cultivo ( $21.978 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) y posterior a eso hubo un aumento de este parámetro con un leve descenso en las concentraciones al final del cultivo (Tabla 20 y Figura 15b).

Tabla 20. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.

<b>Días</b>	<b>DQO (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>				
	R1	R2	R3	Promedio	DE
<b>1</b>	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
<b>3</b>	128.3	151.7	175.0	151.7	23.3
<b>5</b>	101.7	81.7	158.3	113.9	39.8
<b>8</b>	48.3	15.0	28.3	30.6	16.8
<b>10</b>	43.0	14.0	8.3	22.0	18.5
<b>12</b>	61.7	78.3	25.0	55.0	27.3
<b>15</b>	35.0	45.0	58.3	46.1	11.7

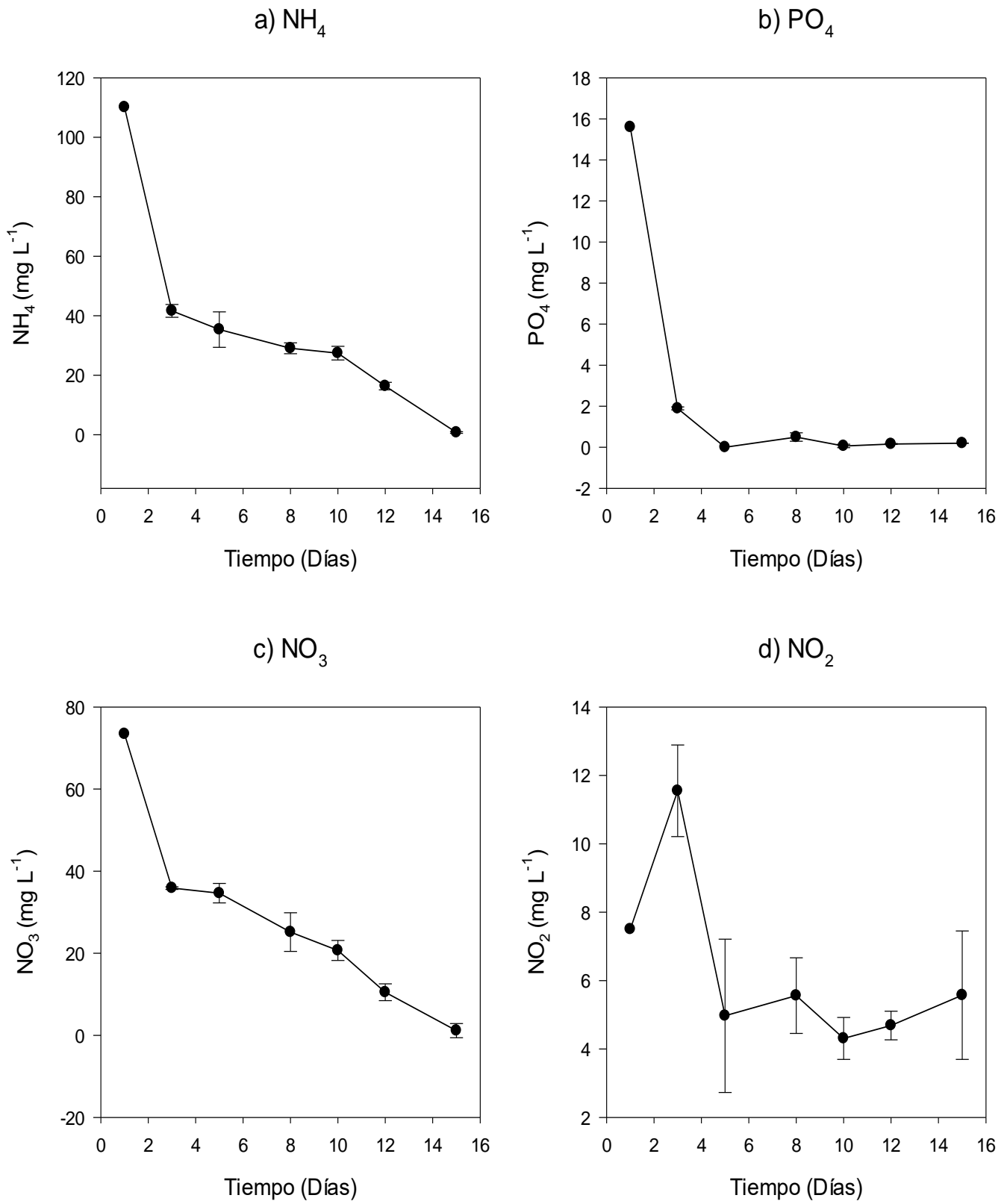


Figura 14. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella* sp. a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos.

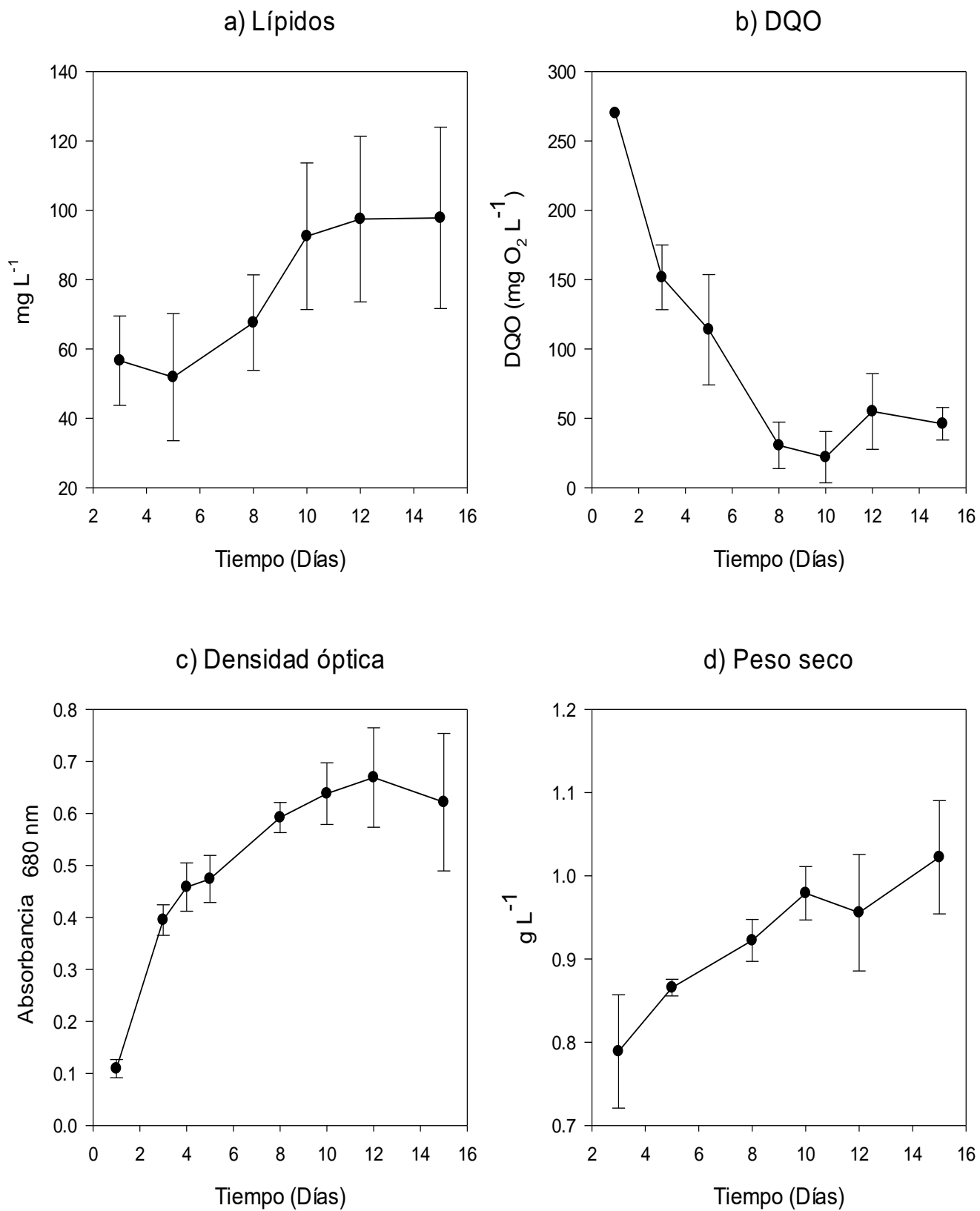


Figura 15. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella* sp. a) Lípidos, b) Demanda química de oxígeno, c) Densidad óptica, d) Peso seco.

### 6.3 Cultivo de *Nannochloropsis oculata*

Los datos del monitoreo de los cultivos de *N. oculata* se muestran en las Tablas 21-28 y Figuras 14-15. En el caso de los ortofosfatos (Tabla 21), la concentración final fue 73.55% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción promedio de 0.76 mg L<sup>-1</sup> Día. Durante los primeros tres días de cultivo la concentración de PO<sub>4</sub> en el ARS disminuyó casi un 50%, posterior a esto, las concentraciones oscilaron entre 9-8 mg L<sup>-1</sup> hasta el día 10 para finalmente disminuir (Figura 16b).

Tabla 21. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

<b>Ortofosfatos (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
<b>3</b>	8.3	8.2	8.5	8.3	0.2
<b>5</b>	9.4	9.1	9.8	9.4	0.3
<b>8</b>	8.6	8.2	7.5	8.1	0.6
<b>10</b>	8.7	7.8	7.5	8.0	0.6
<b>12</b>	7.4	6.7	6.1	6.7	0.6
<b>15</b>	4.5	3.9	4.0	4.2	0.3

El monitoreo de NH<sub>4</sub> de *N. oculata* mostró una remoción del 95.75% de este compuesto en el último día de cultivo, esto con una tasa de disminución promedio de 6.38 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. De forma parecida a los ortofosfatos, la concentración de NH<sub>4</sub> disminuyó alrededor del 50% durante los primeros tres días de cultivo (Tabla 22 y Figura 16a).

Tabla 22. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

<b>Nitrógeno amoniacal (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
<b>3</b>	55.3	46.2	59.1	53.5	6.6
<b>5</b>	34.0	36.0	25.3	31.7	5.7
<b>8</b>	25.3	26.7	26.7	26.3	0.8
<b>10</b>	15.3	19.3	17.0	17.2	2.0
<b>12</b>	DLD	17.7	DLD	5.9	10.2
<b>15</b>	3.2	5.6	5.1	4.7	1.3

DLD: Debajo del límite de detección.

Posterior a esto la tasa de disminución fue de  $5.2 \text{ mg L}^{-1}$  hasta el día 12, cuando se encontraron concentraciones de  $\text{NH}_4$  por debajo del límite de detección del método. Es necesario resaltar que en el último día de cultivo se registraron concentraciones muy bajas (pero detectables) de este compuesto.

Siguiendo con las fracciones de nitrógeno, las concentraciones registradas de  $\text{NO}_2$  al día final de cultivo fueron en promedio 52.9% menores a la inicial (Tabla 23). La tasa de disminución para esto fue de  $0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Sin embargo, a partir del tercer día de cultivo y hasta el día 15 las concentraciones de  $\text{NO}_2$  en el medio se mantuvieron entre  $3\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$ , podemos apreciar lo anterior en la Figura 16d como una línea con una baja pendiente durante la mayor parte del experimento.

Tabla 23. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

<b>Nitritos (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
<b>3</b>	3.8	4.2	4.4	4.2	0.3
<b>5</b>	3.7	2.9	3.9	3.5	0.5
<b>8</b>	4.5	3.9	3.9	4.1	0.4
<b>10</b>	3.9	4.0	3.9	3.9	0.1
<b>12</b>	2.9	4.0	3.9	3.6	0.6
<b>15</b>	3.2	3.7	3.7	3.5	0.3

En cuanto al  $\text{NO}_3$ , el medio de cultivo de *N. oculata* mostró un descenso del 70.6% en las concentraciones de este compuesto al día 15, con una tasa de disminución promedio de  $3.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  (Tabla 24). Es necesario mencionar que la concentración de  $\text{NO}_3$  disminuyó solo 6.8% ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante los últimos ocho días de cultivo, por lo que la primera mitad del experimento fue el periodo donde se tuvo la cinética de remoción más alta  $5.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  (Figura 16c).



Tabla 24. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	56.7	53.0	50.9	53.5	2.9
5	46.9	35.7	38.4	40.3	5.9
8	28.2	19.4	30.8	26.2	6.0
10	32.3	16.8	24.7	24.6	7.7
12	27.2	20.0	27.0	24.8	4.1
15	24.1	20.0	20.6	21.6	2.2

La concentración de lípidos en biomasa se muestra en la Tabla 25 y Figura 17a. La productividad de estos fue de 4.8 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, podemos mencionar que durante los primeros diez días de cultivo la concentración de estos creció de manera muy lenta, mientras que entre los días 12 y 15, se registró un aumento de aproximadamente el doble en la concentración de lípidos en biomasa. Esto pudo deberse a que se alcanzaron condiciones de estrés por nitrógeno en el medio y será discutido más adelante.

Tabla 25. Concentración de lípidos en la biomasa de *Nannochloropsis oculata*.

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
3	14.2	16.3	12.1	14.2	2.1
5	23.9	23.4	4.8	17.4	10.9
8	23.9	26.6	11.5	20.7	8.1
10	24.7	29.7	16.4	23.6	6.7
12	36.9	41.6	33.3	37.3	4.2
15	57.9	93.8	65.2	72.3	19.0

El monitoreo de la densidad óptica de los cultivos se muestra en la Tabla 26 y Figura 17b. Estos datos muestran que los cultivos de *N. oculata* tuvieron su fase logarítmica de crecimiento durante los primeros ocho días de cultivo, mientras que a partir del décimo día se alcanza la fase estacionaria. Se puede resaltar que la densidad óptica tuvo un aumento considerable el último día de monitoreo, en lugar de un descenso

como habría de esperarse en el caso de que los cultivos que alcanzaran la fase de muerte.

Tabla 26. Densidad óptica de los cultivos de *Nannochloropsis oculata*.

<b>Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	0.108	0.086	0.123	0.106	0
<b>2</b>	0.034	0.077	0.121	0.077	0.044
<b>3</b>	0.118	0.117	0.120	0.118	0.002
<b>4</b>	0.110	0.162	0.140	0.137	0.026
<b>8</b>	0.187	0.168	0.177	0.177	0.010
<b>10</b>	0.246	0.292	0.209	0.249	0.042
<b>12</b>	0.286	0.295	0.217	0.266	0.043
<b>15</b>	0.303	0.300	0.245	0.283	0.033

Los datos de peso seco de la biomasa (Tabla 27) refieren una productividad promedio de  $52 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . En el día 12 de experimento se pudieron registrar pesos secos por encima de  $1 \text{ g L}^{-1}$ . En la Figura 17d podemos observar que el crecimiento del peso seco de la biomasa muestra que la fase logarítmica se encuentra en los primeros diez días de cultivo, mientras que los días restantes del experimento parecen corresponder a la fase estacionaria. La tasa de crecimiento específico de este cultivo fue de  $0.08 \text{ Día}^{-1}$ .

Tabla 27. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Nannochloropsis oculata*.

<b>Peso seco (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>					
<b>3</b>	0.586	0.586	0.406	0.526	0.104
<b>5</b>	0.686	0.656	0.686	0.676	0.017
<b>8</b>	0.776	0.796	0.806	0.792	0.015
<b>10</b>	0.996	0.956	0.896	0.949	0.050
<b>12</b>	1.026	1.036	1.166	1.076	0.078
<b>15</b>	1.098	1.087	1.268	1.151	0.101

La DQO del medio de cultivo, mostró una tendencia a la baja durante la mayor parte del experimento, sin embargo, el día diez de cultivo mostró un aumento en este parámetro con respecto al anterior punto de monitoreo. La DQO final fue 95.9%

menor a la inicial, con una tasa de disminución de 17.2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> (Tabla 28, Figura 17c).

Tabla 28. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

Días	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	DE
1	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
3	148.4	148.3	181.7	165.0	23.6
5	95.0	38.3	118.3	83.9	41.1
8	75.0	8.3	115.0	66.1	53.9
10	58.3	81.7	91.7	77.2	17.1
12	8.3	35.0	88.3	43.9	40.7
15	15.0	DLD	18.3	11.1	9.8

DLD: Debajo del límite de detección.

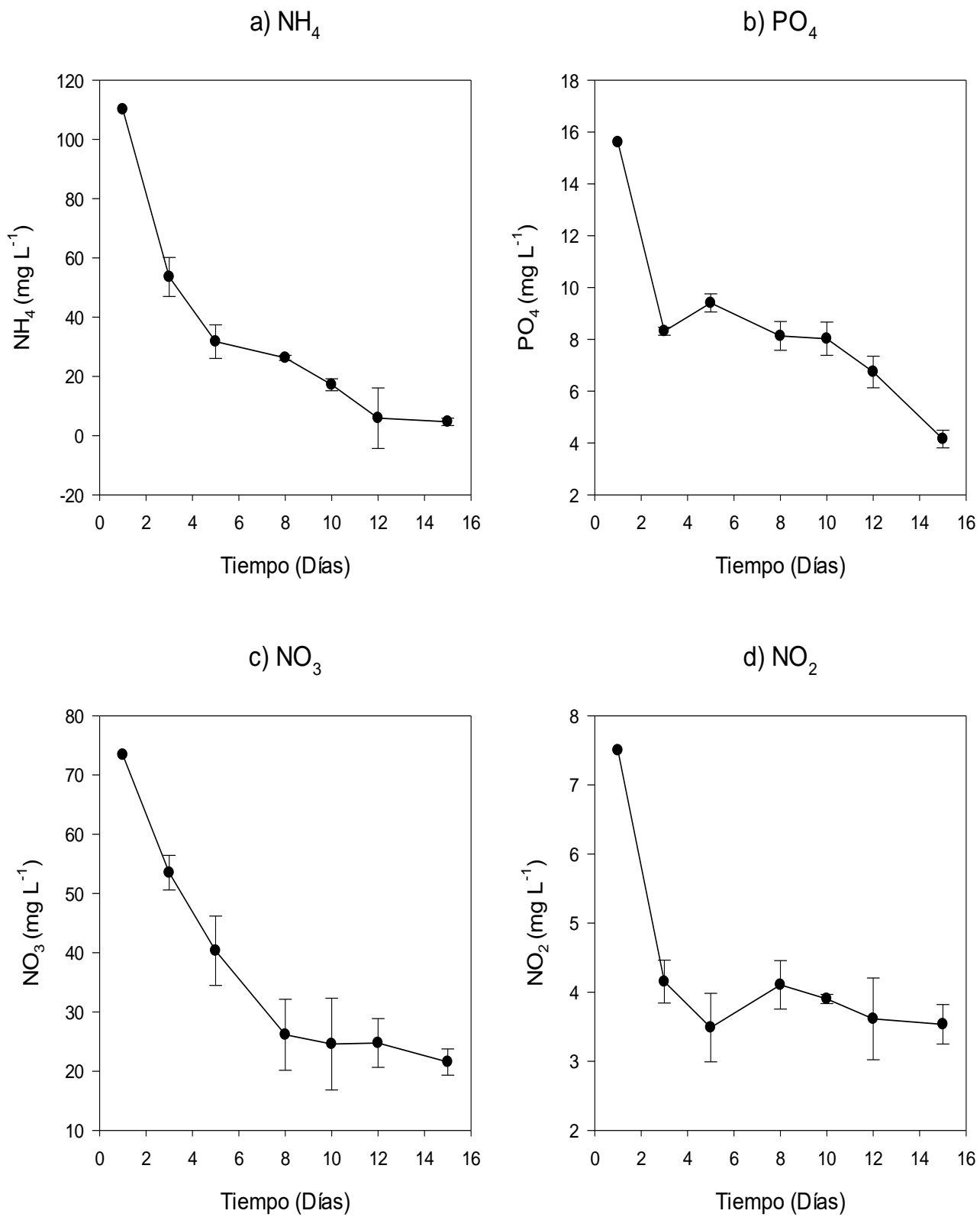


Figura 16. Perfil de remoción en los cultivos de *Nannochloropsis oculata*. a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos

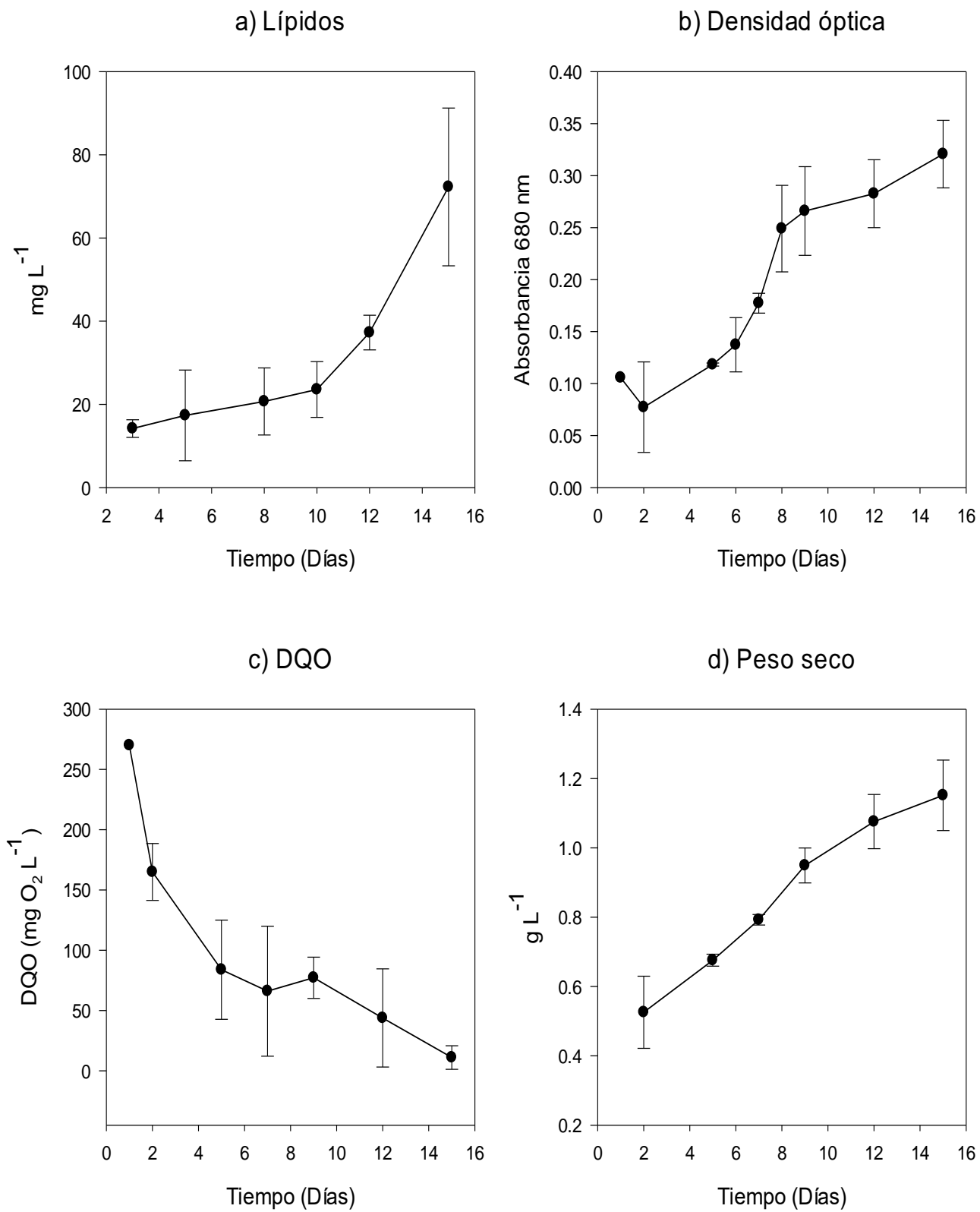


Figura 17. Perfil de remoción en los cultivos de *Nannochloropsis oculata*. a) Lípidos, b) Demanda química de oxígeno, c) Densidad óptica, d) Peso seco.

#### 6.4 Cultivo de *Tetraselmis chui*

Los resultados de los cultivos de *T. chui* se muestran en las Tablas 29-36 y Figuras 16-17. Se encontró que la concentración final de este compuesto fue en promedio 98.6% menor a la inicial, con una cinética de remoción de  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  (Tabla 29). Se alcanzaron concentraciones bajas de este compuesto a partir del día cinco de cultivo, mientras al octavo día comenzaron a registrarse concentraciones por debajo del límite de detección, las cuales mantuvieron hasta el último día del experimento. El último día del monitoreo, las concentraciones se elevaron lo suficiente como para ser cuantificadas (Figura 18a).

Tabla 29. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de *Tetraselmis chui*.

Días	Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	0.8	7.7	11.9	6.8	5.6
5	1.2	2.8	2.8	2.3	0.9
8	DLD	DLD	3.3	1.1	1.9
10	DLD	DLD	1.7	0.6	1.0
12	DLD	DLD	0.2	0.1	0.1
15	0.0	0.2	0.5	0.2	0.3

DLD: Debajo del límite de detección.

Las concentraciones finales de nitrógeno amoniacal (Tabla 30) de este experimento mostraron ser 75% menores en promedio a las iniciales, para esto los cultivos mostraron una cinética de remoción de  $5.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Las concentraciones de  $\text{NH}_4$  se mantuvieron oscilando entre 23-27  $\text{mg L}^{-1}$  durante los últimos 5 días de cultivo y se puede mencionar que aproximadamente el 46.2% del  $\text{NH}_4$  en los cultivos fue removido del medio durante los primeros tres días de experimento con una cinética de remoción de  $16.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Se puede resaltar que en el octavo y doceavo día de cultivo se registraron leves aumentos en las concentraciones de  $\text{NH}_4$  con respecto a punto anterior de monitoreo (Figura 18b).

Tabla 30. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de *Tetraselmis chui*.

Días	Nitrógeno amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	60.2	58.6	58.8	59.2	0.9
5	38.8	26.0	35.1	33.3	6.6
8	48.9	47.4	49.0	48.5	0.9
10	29.6	17.8	23.5	23.6	5.9
12	35.7	48.2	45.2	43.0	6.5
15	30.6	21.8	28.7	27.1	4.6

En el caso de los nitritos la concentración final de estos fue 1.4 % menor a la inicial (Tabla 31), sin embargo, para esta fracción de nitrógeno se registraron concentraciones mayores a la inicial durante la mayor parte del experimento, con oscilaciones dentro de 11-13 mg L<sup>-1</sup> y un aumento de hasta el 200% entre los días tres y 12 (Figura 18c).

Tabla 31. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de *Tetraselmis chui*.

Días	Nitritos (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
1	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
3	8.7	6.3	11.0	8.7	2.3
5	11.9	11.1	10.1	11.0	0.9
8	13.1	13.3	13.5	13.3	0.2
10	10.4	11.3	13.5	11.7	1.6
12	13.5	13.9	14.0	13.8	0.3
15	7.4	7.8	7.0	7.4	0.4

La concentración final de nitratos en el medio de cultivo de *T. chui* fue en promedio 100% menor a la inicial (cinética de remoción 4.8 mg L<sup>-1</sup> Día), esto debido a que las concentraciones de esta fracción de nitrógeno en todos los cultivos estuvieron por debajo del límite de detección el último día de monitoreo (Tabla 32). Cabe mencionar que en los días cinco y 10 de cultivo se registraron aumentos en las concentraciones de NO<sub>3</sub> con respecto al punto de monitoreo anterior (Figura 18b).

Tabla 32. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de *Tetraselmis chui*.

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	8.2	11.0	8.8	9.3	1.5
5	21.1	30.0	27.9	26.4	4.7
8	7.4	3.8	6.5	5.9	1.9
10	19.5	16.1	21.0	18.9	2.5
12	1.9	DLD	DLD	0.6	1.1
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

La productividad de lípidos en biomasa de los cultivos de *T. chui* fue 2.5 mg L<sup>-1</sup> Día (Tabla 33). Se puede notar que el mayor aumento en la concentración de estos se dio durante los primeros cinco días de cultivo, siendo que, durante los últimos diez días de experimento la concentración de lípidos solo aumento 6 mg L<sup>-1</sup>. El octavo día de cultivo se registró una concentración de lípidos menor a la del punto anterior de monitoreo en dos de los tres reactores (Figura 19b).

Tabla 33. Concentración de lípidos en la biomasa de *Tetraselmis chui*.

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
3	15.3	1.3	1.5	6.0	8.0
5	23.1	33.6	31.2	29.3	5.5
8	23.4	28.7	25.0	25.7	2.7
10	25.6	33.4	26.1	28.3	4.4
12	35.5	41.7	28.2	35.2	6.8
15	33.6	28.8	45.5	36.0	8.6

El registro de la densidad óptica *T. chui* mostró que los cultivos tuvieron su fase logarítmica de crecimiento entre los días uno y cinco del experimento, mientras que los días restantes de cultivo corresponden a la fase estacionaria, podemos resaltar que el día 14 de monitoreo la densidad óptica promedio fue mayor a registrada en el día inmediato anterior (Tabla 34, Figura 19a).



Tabla 34. Densidad óptica de los cultivos de *Tetraselmis chui*.

<b>Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	0.018	0.165	0.121	0.101	0.076
<b>2</b>	0.206	0.206	0.179	0.197	0.016
<b>5</b>	0.294	0.320	0.368	0.327	0.038
<b>6</b>	0.246	0.397	0.408	0.350	0.091
<b>7</b>	0.285	0.390	0.355	0.343	0.053
<b>9</b>	0.285	0.398	0.361	0.348	0.058
<b>12</b>	0.321	0.475	0.231	0.342	0.123
<b>14</b>	0.291	0.475	0.346	0.371	0.094
<b>15</b>	0.313	0.466	0.238	0.339	0.116

El peso seco de la biomasa de *T. chui* mostró un comportamiento inusual (Tabla 35, Figura 19d), ya que entre el día tres y ocho los cultivos tuvieron una productividad positiva de  $38 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ , sin embargo, a partir del día diez de experimento se empezaron a registrar pesos secos en concentraciones paulatinamente menores, las cuales para el último día de cultivo fueron en promedio muy similares a la inicial, con sólo diferencia de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . La tasa específica de crecimiento de estos cultivos fue de  $0.05 \text{ Día}^{-1}$ .

Tabla 35. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Tetraselmis chui*.

<b>Peso seco (g L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>3</b>	0.706	0.646	0.606	0.652	0.050
<b>5</b>	0.766	0.716	0.726	0.736	0.026
<b>8</b>	0.836	0.846	0.856	0.846	0.010
<b>10</b>	0.780	0.780	0.750	0.770	0.017
<b>12</b>	0.750	0.720	0.670	0.713	0.040
<b>15</b>	0.650	0.710	0.640	0.667	0.038

La demanda química de oxígeno (Tabla 36) del medio de cultivo de *T. chui* tuvo una concentración promedio 83.7% menor a la inicial, esto con una cinética de disminución de  $15.1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Se puede mencionar que se alcanza una

concentración baja de este parámetro el octavo día de cultivo, sin embargo, se registró un aumento en posteriores días de cultivo (Figura 19c).

Tabla 36. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Tetraselmis chui*.

Días	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
<b>3</b>	138.3	101.7	185.0	141.7	41.8
<b>5</b>	98.4	115.0	191.7	135.0	49.7
<b>8</b>	DLD	DLD	78.3	26.1	45.2
<b>10</b>	15.0	65.0	71.7	50.6	31.0
<b>12</b>	35.0	DLD	14.0	16.7	17.6
<b>15</b>	54.0	25.0	51.7	43.9	16.4

DLD: Debajo del límite de detección.

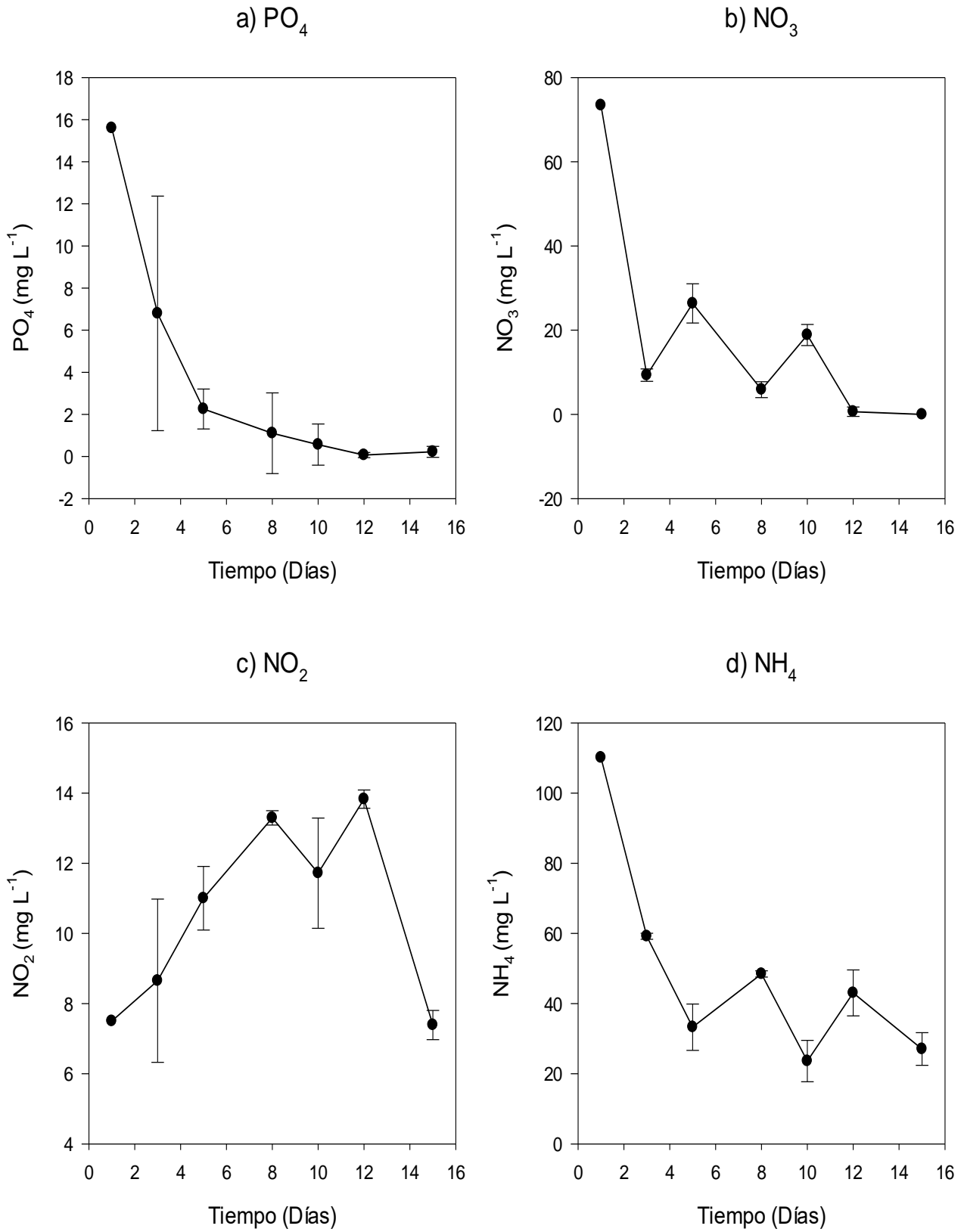


Figura 18. Perfil de remoción en los cultivos de *Tetraselmis chui*. a) Ortofosfatos, b) Nitratos, c) Nitritos, d) Amonio

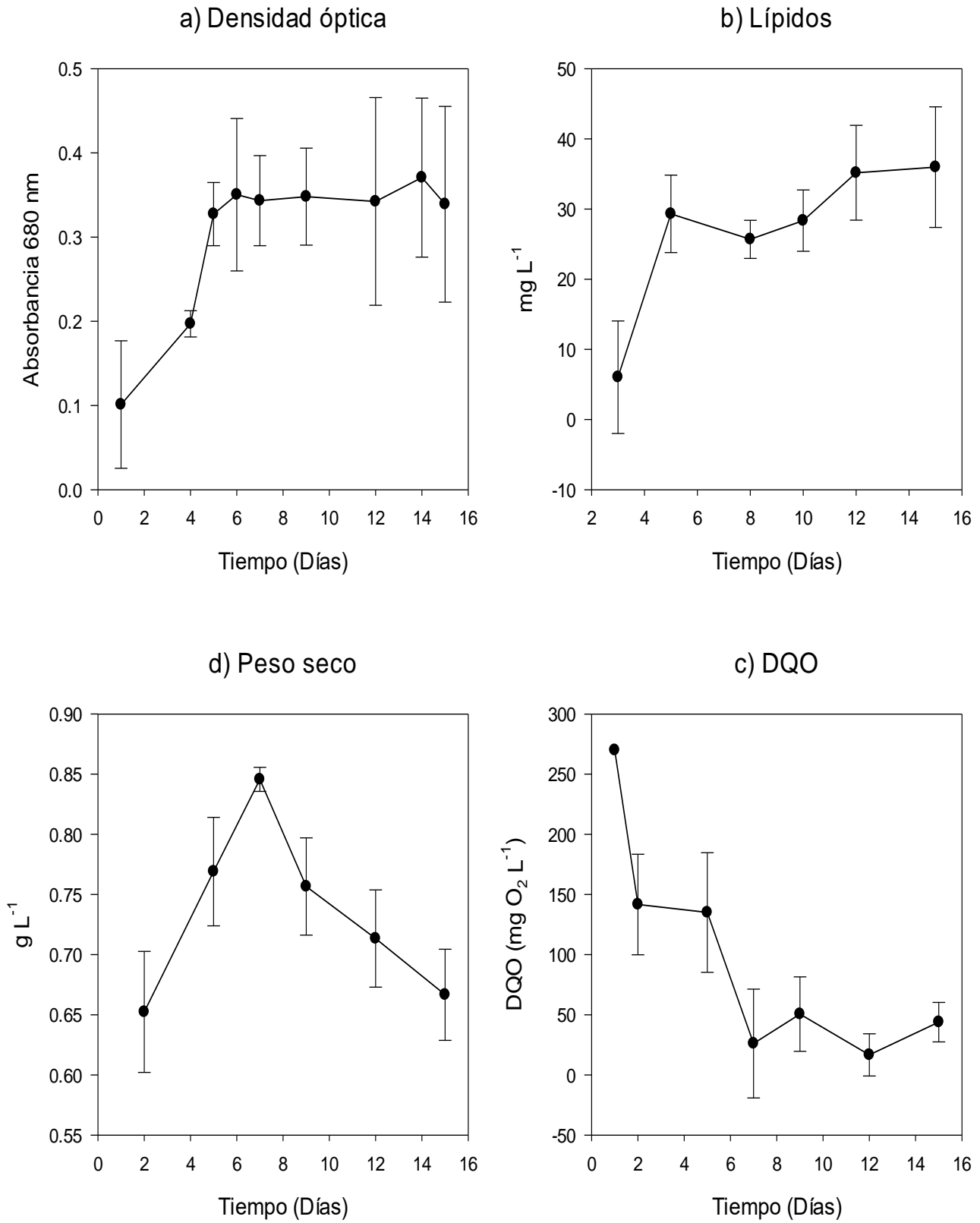


Figura 19. Perfil de remoción en los cultivos de *Tetraselmis chui*. a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno.

## 6.5 Cultivo *Dunaliella sp.*- *Nannochloropsis oculata*

Los datos del monitoreo del cultivo de *Dunaliella sp.*-*N. oculata* se muestran en las tablas 37-44, Figuras 20-21.

El registro de ortofosfatos del cultivo D+ N (Tabla 37) mostró una remoción del 100% de este compuesto al último día de cultivo. Se puede destacar que al tercer día del experimento la disminución de  $\text{PO}_4$  fue del 83.6%, por lo que el periodo entre el primer y tercer de cultivo tuvo la cinética de remoción más elevada con  $4.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  (Figura 20d). Así mismo, a partir del día diez de cultivo las concentraciones de  $\text{PO}_4$  se mantuvieron en su mayoría por debajo del límite de detección.

Tabla 37. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de *Dunaliella sp.*- *N. oculata*

Días	Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	4.3	2.1	1.4	2.6	1.5
5	1.2	1.2	0.7	1.0	0.3
8	DLD	0.2	DLD	0.1	0.1
10	1.3	DLD	DLD	0.4	0.7
12	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

El monitoreo del  $\text{NH}_4$  se muestra en la Tabla 38. La concentración final de este compuesto fue en promedio 81.8% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de  $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Es necesario mencionar que, al octavo día de cultivo se registraron concentraciones de  $\text{NH}_4$  por debajo del límite de detección en dos de los tres cultivos experimentales, no obstante, a partir del décimo día se registraron concentraciones ascendentes de este compuesto en todos los cultivos.

Tabla 38. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

Días	Nitrógeno amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	7.8	12.6	5.6	8.7	3.6
5	2.0	1.8	8.2	4.0	3.6
8	DLD	DLD	0.3	0.1	0.2
10	3.5	DLD	DLD	1.2	2.0
12	3.0	3.5	DLD	2.2	1.9
15	17.1	25.0	17.8	20.0	4.4

DLD: Debajo del límite de detección.

Durante los primeros tres días de cultivo se registró una disminución promedio del 92.1% del NH<sub>4</sub> del medio, con una cinética de remoción del 33.8 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> (Figura 20a).

La concentración final promedio de nitritos fue 67.3% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de 0.3 mg L<sup>-1</sup> Día, sin embargo, se registraron concentraciones mayores a la inicial durante los primeros nueve días de experimento, periodo en el cual las concentraciones de NO<sub>2</sub> oscilaron entre 9.3 y 8.2 mg L<sup>-1</sup>. (Tabla 39, Figura 20b).

Tabla 39. Concentración de nitritos amoniacal en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

Días	Nitritos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
3	9.1	6.8	12.2	9.4	2.7
5	8.4	10.8	7.6	8.9	1.7
8	7.8	9.9	10.8	9.5	1.5
10	7.2	10.0	7.5	8.3	1.5
12	6.3	5.4	5.1	5.6	0.6
15	1.6	3.3	2.4	2.5	0.8

Las concentraciones de nitratos registradas al final del experimento fueron en promedio 88.6% menores a la inicial, esto con una cinética de remoción de 4.3 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> (Tabla 40, Figura 20c). Sobre este parámetro se puede mencionar que

entre los días ocho y diez de cultivo no existió un cambio notable en las concentraciones, pero a partir del doceavo día de cultivo se registró nuevamente una disminución de en la presencia de este compuesto.

Tabla 40. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	55.2	58.2	45.2	52.8	6.8
5	53.0	52.7	43.2	49.6	5.5
8	35.0	37.0	33.7	35.2	1.7
10	32.4	38.5	35.4	35.4	3.1
12	11.9	13.7	10.8	12.1	1.4
15	9.8	6.7	8.7	8.4	1.6

DLD: Debajo del límite de detección.

La concentración de lípidos en biomasa tuvo una productividad promedio de 6.8 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> al último día de cultivo. Entre los días 10 y 12 de experimento se puede notar un aumento del 60% en la concentración de estos metabolitos en la biomasa algal, por lo que este fue el periodo con la productividad más alta (Tabla 41, Figura 21b). La tasa específica de crecimiento de estos cultivos fue de 0.03 Día<sup>-1</sup>.

Tabla 41. Concentración de lípidos en la biomasa de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
3	8.5	6.2	8.0	7.6	1.2
5	42.5	26.3	29.7	32.9	8.5
8	52.8	49.0	48.9	50.2	2.2
10	42.3	42.0	37.3	40.5	2.8
12	112.4	92.4	105.6	103.5	10.2
15	93.0	104.3	134.0	110.4	21.2

El monitoreo de la densidad óptica de los cultivos mostró que estos alcanzaron la fase estacionaria entre el octavo y noveno día de experimento, mientras que el periodo entre el quinto y octavo día parece corresponder a la fase estacionaria (Tabla 42, Figura 21a).

Tabla 42. Densidad óptica de los cultivos de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

<b>Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	0.136	0.122	0.217	0.158	0.000
<b>2</b>	0.187	0.157	0.271	0.205	0.059
<b>5</b>	0.225	0.198	0.328	0.250	0.069
<b>6</b>	0.413	0.281	0.363	0.352	0.067
<b>7</b>	0.549	0.398	0.368	0.438	0.097
<b>9</b>	0.530	0.468	0.439	0.479	0.046
<b>12</b>	0.557	0.516	0.461	0.511	0.048
<b>14</b>	0.513	0.591	0.580	0.561	0.042
<b>15</b>	0.671	0.519	0.449	0.546	0.113

El peso seco de la biomasa tuvo una productividad promedio de 27.5 mg L<sup>-1</sup> Día (Tabla 43, Figura 21c), sobre el monitoreo de este parámetro podemos resaltar que se registró un crecimiento negativo en el promedio de biomasa entre los días ocho y 10.

Tabla 43. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

<b>Peso seco (g L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>3</b>	0.680	0.590	0.750	0.673	0.080
<b>5</b>	0.660	0.780	0.800	0.747	0.076
<b>8</b>	0.820	0.700	0.880	0.800	0.092
<b>10</b>	0.740	0.760	0.850	0.783	0.059
<b>12</b>	0.920	0.780	0.870	0.857	0.071
<b>15</b>	1.040	0.990	0.980	1.003	0.032

Los resultados del monitoreo de la DQO se muestran en la Tabla 44 y Figura 21d. La concentración final promedio de este compuesto fue 84.5% menor a la inicial con una cinética de remoción de 15.2 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Se puede resaltar que entre los días tres y 10 de experimento se registraron concentraciones debajo del límite de detección en todos los cultivos, mientras que en el periodo entre días 12 y 15 se detectaron concentraciones ascendentes de este parámetro.



Tabla 44. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*

<b>Días</b>	<b>DQO (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>)</b>				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
<b>1</b>	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
<b>3</b>	51.7	41.7	65.0	52.8	11.7
<b>5</b>	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
<b>8</b>	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
<b>10</b>	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
<b>12</b>	DLD	54.7	38.3	31.0	28.1
<b>15</b>	18.3	58.3	48.3	41.7	20.8

DLD: Debajo del límite de detección.

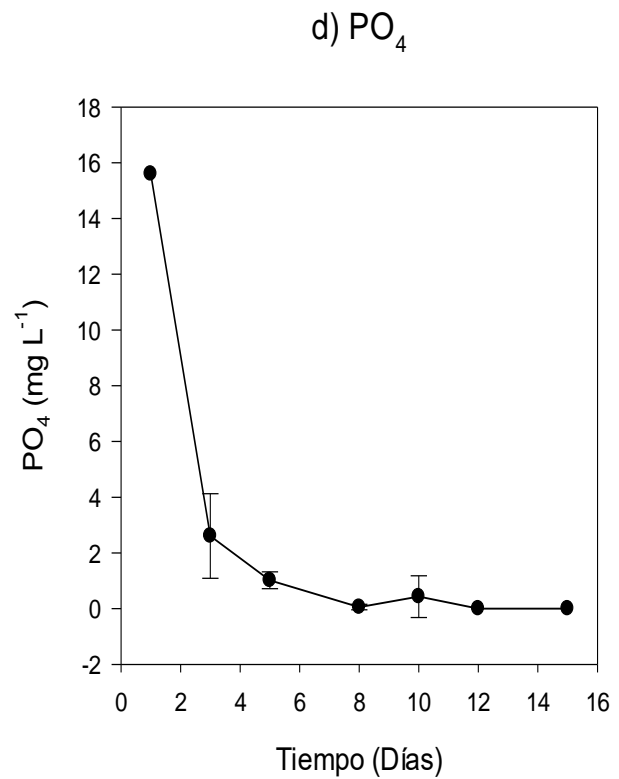
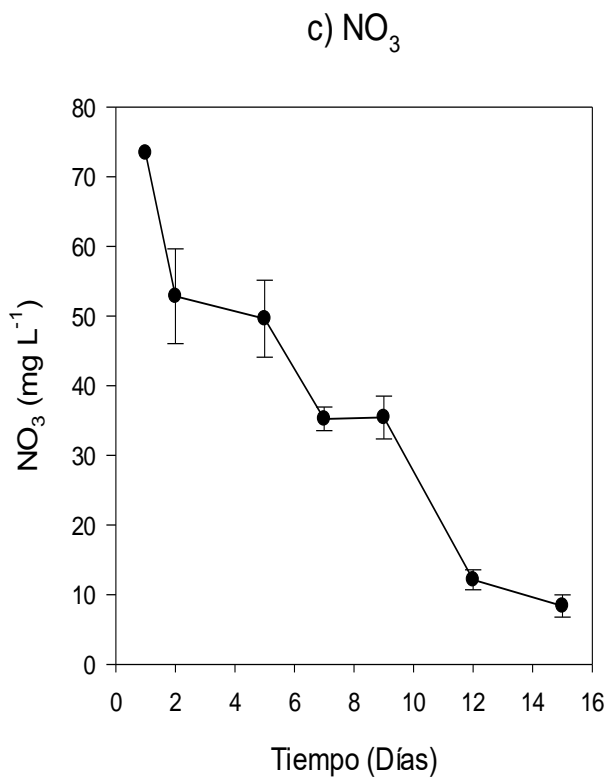
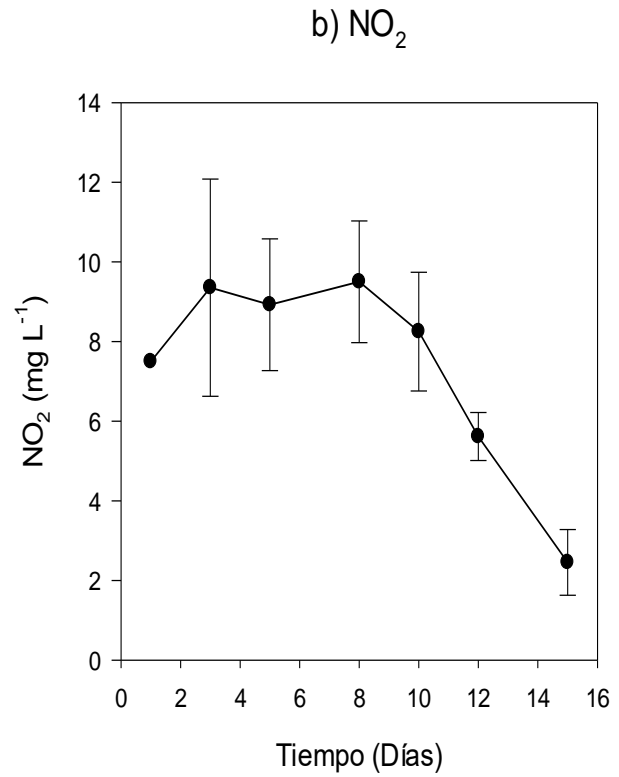
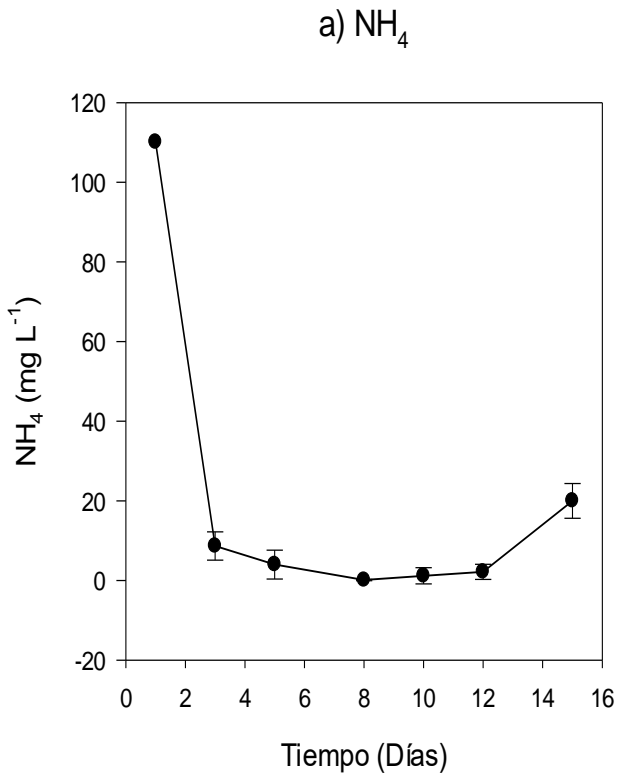


Figura 20. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*. a) Amonio, b) Nitritos, c) Nitratos, d) Ortofosfatos.

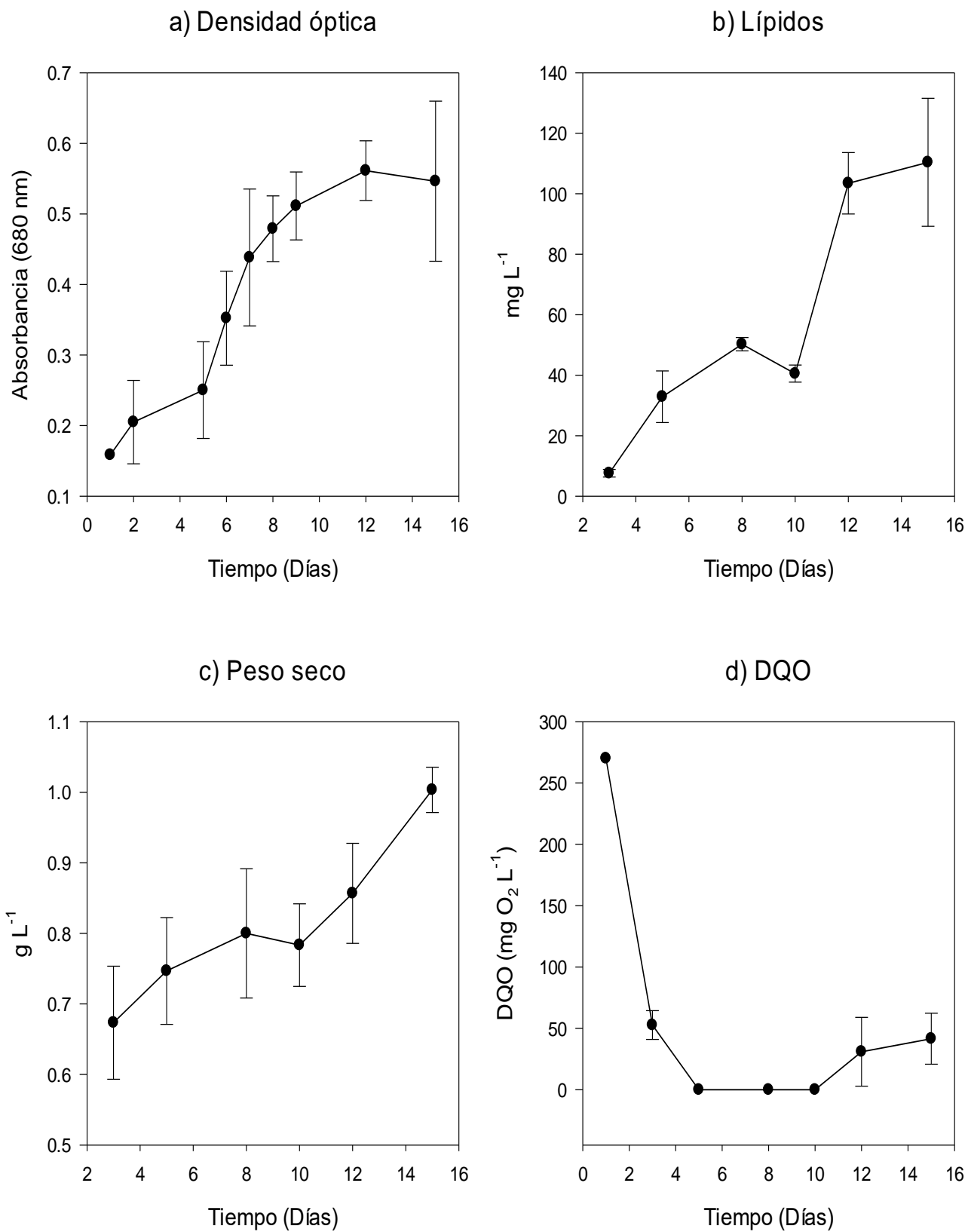


Figura 21. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *N. oculata*. a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno

## 6.6 Cultivo *Tetraselmis chui* - *Nannochloropsis oculata*

Los resultados del monitoreo del cultivo de *Tetraselmis chui* - *Nannochloropsis oculata* se muestran en las Tablas 45-52.

Para los ortofosfatos la concentración final promedio fue 100% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de  $1.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Se puede mencionar que el día 12 de experimento se registró un leve aumento en las concentraciones de  $\text{PO}_4$  (Tabla 45, Figura 22b).

Tabla 45. Concentración de ortofosfatos en el medio de cultivo de *T. chui*- *N. oculata*

Días	Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	9.0	8.5	9.3	8.9	0.4
5	4.6	4.9	4.7	4.7	0.2
8	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1
10	0.0	DLD	DLD	0.0	0.0
12	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

Para el caso del nitrógeno amoniacal, la concentración final promedio fue 100% menor a la inicial esto con una cinética de remoción de  $7.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  (Tabla 46). Se puede destacar que a partir del octavo día de cultivo las concentraciones en los cultivos fluctuaron entre DLD y  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Durante los primeros tres días de cultivo se registró una disminución del 76.6% (Figura 22a).

Tabla 46. Concentración de nitrógeno amoniacal en el medio de cultivo de *T. chui*- *N. oculata*

Días	Nitrógeno amoniacal ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	28.5	26.5	22.3	25.8	3.1
5	22.2	21.1	18.9	20.7	1.7
8	DLD	2.6	1.4	1.3	1.3
10	DLD	1.1	DLD	0.4	0.6
12	1.5	2.2	0.6	1.4	0.8
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

El monitoreo de nitritos mostró una remoción total de este compuesto a partir del día 12 de experimento (cinética de remoción  $0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ ; Tabla 47). Se puede resaltar que comenzaron a encontrarse concentraciones por debajo del límite de detección de  $\text{NO}_2$  a partir del día diez de cultivo (Figura 22d).

Tabla 47. Concentración de nitritos en el medio de cultivo de *T. chui- N. oculata*

<b>Nitritos (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
<b>3</b>	2.4	1.8	2.3	2.2	0.3
<b>5</b>	0.3	1.2	1.4	1.0	0.5
<b>8</b>	0.6	0.6	0.5	0.5	0.1
<b>10</b>	0.2	DLD	DLD	0.1	0.1
<b>12</b>	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
<b>15</b>	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

El  $\text{NO}_3$ , registro una concentración promedio al día 15 de cultivo 73.4%, esto con una cinética de remoción de  $3.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}$  (Tabla 48, Figura 22c), aunque pudo encontrarse una concentración 75.1% en el doceavo día del monitoreo.

Tabla 48. Concentración de nitratos en el medio de cultivo de *T. chui- N. oculata*

<b>Nitratos (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>					
<b>Días</b>	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
<b>3</b>	60.7	65.3	64.7	63.6	2.5
<b>5</b>	43.2	56.4	46.3	48.6	6.9
<b>8</b>	24.0	21.6	28.8	24.8	3.6
<b>10</b>	21.9	15.3	26.9	21.4	5.9
<b>12</b>	14.0	18.3	22.5	18.3	4.3
<b>15</b>	19.5	15.5	12.9	19.5	15.5

La productividad de lípidos (Tabla 49, Figura 23c) fue de  $3.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}$ . En el periodo entre los días tres y cinco se registró un aumento del 74% en la concentración de estos compuestos, por lo que este lapso fue el de mayor productividad en el experimento.

Tabla 49. Concentración de lípidos en la biomasa de *T. chui- N. oculata*

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
3	9.9	3.4	5.0	6.1	3.4
5	19.9	29.6	21.2	23.6	5.3
8	26.6	28.3	23.7	26.2	1.9
10	29.1	30.1	35.8	31.7	3.0
12	43.1	45.2	42.3	43.5	1.5
15	46.3	45.5	44.4	45.4	0.9

El monitoreo de la densidad óptica de los experimentos mostró que estos alcanzaron la fase estacionaria de cultivo aproximadamente al octavo día, por lo que los primeros ocho días podrían considerarse como la fase logarítmica (Tabla 50, Figura 23a).

Tabla 50. Densidad óptica de los cultivos de *T. chui- N. oculata*

Días	Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	0.088	0.064	0.071	0.074	0.012
2	0.132	0.127	0.147	0.135	0.010
5	0.154	0.132	0.154	0.147	0.013
6	0.214	0.286	0.245	0.248	0.036
7	0.248	0.304	0.278	0.277	0.028
9	0.291	0.383	0.315	0.330	0.048
12	0.306	0.407	0.317	0.343	0.055
14	0.319	0.386	0.341	0.349	0.034
15	0.327	0.375	0.355	0.352	0.024

Los cultivos de *T. chui- N. oculata* tuvieron una productividad de peso seco de 23.1 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, con una concentración máxima de biomasa al último día de cultivo (Tabla 51, Figura 23c). La tasa específica de crecimiento de estos cultivos fue de 0.05 Día<sup>-1</sup>.

Tabla 51. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *T. chui- N. oculata*

Días	Peso seco (g L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
<b>1</b>					
<b>3</b>	0.720	0.680	0.700	0.700	0.020
<b>5</b>	0.864	0.724	0.804	0.798	0.070
<b>8</b>	0.970	0.900	0.880	0.917	0.047
<b>10</b>	0.980	0.950	0.940	0.957	0.021
<b>12</b>	0.990	0.980	0.930	0.967	0.032
<b>15</b>	1.010	0.970	0.950	0.977	0.031

La demanda química de oxígeno (Tabla 52) mostró una concentración al día 15 de experimento 91.1% menor a la inicial eso con una cinética de remoción de 16.4 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> Día (Figura 23b).

Tabla 52. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *T. chui- N. oculata*

Días	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )				Desviación estándar
	R1	R2	R3	Promedio	
<b>1</b>	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
<b>3</b>	184.0	171.7	185.7	180.4	7.6
<b>5</b>	38.6	48.3	36.4	41.1	6.4
<b>8</b>	45.0	71.7	68.3	61.7	14.5
<b>10</b>	31.7	68.3	61.7	53.9	19.5
<b>12</b>	24.7	37.3	26.7	29.6	6.8
<b>15</b>	10.7	27.3	34.0	24.0	12.0

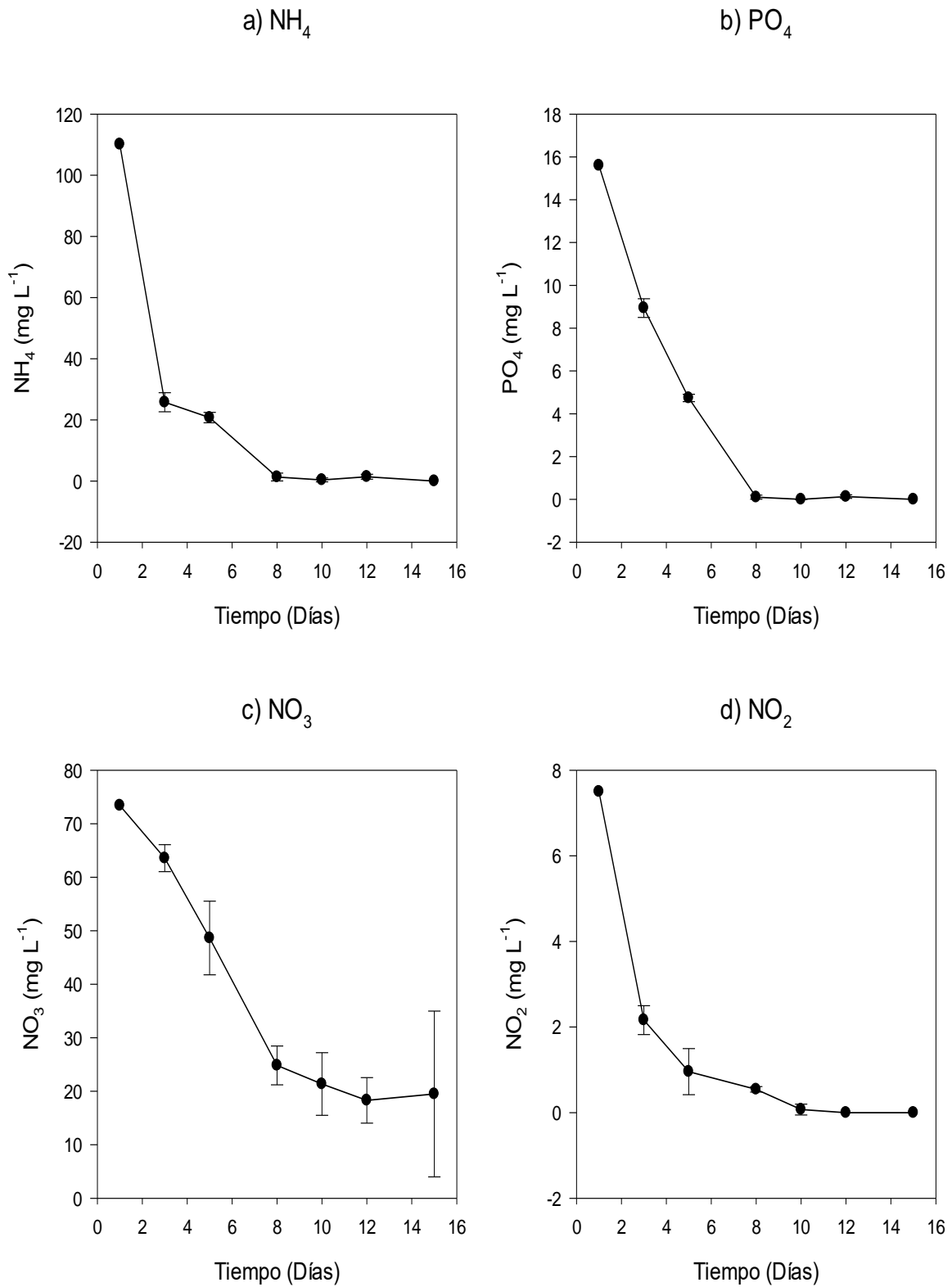


Figura 22. Perfil de remoción en los cultivos de *T. chui*-*N. oculata*. a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos.



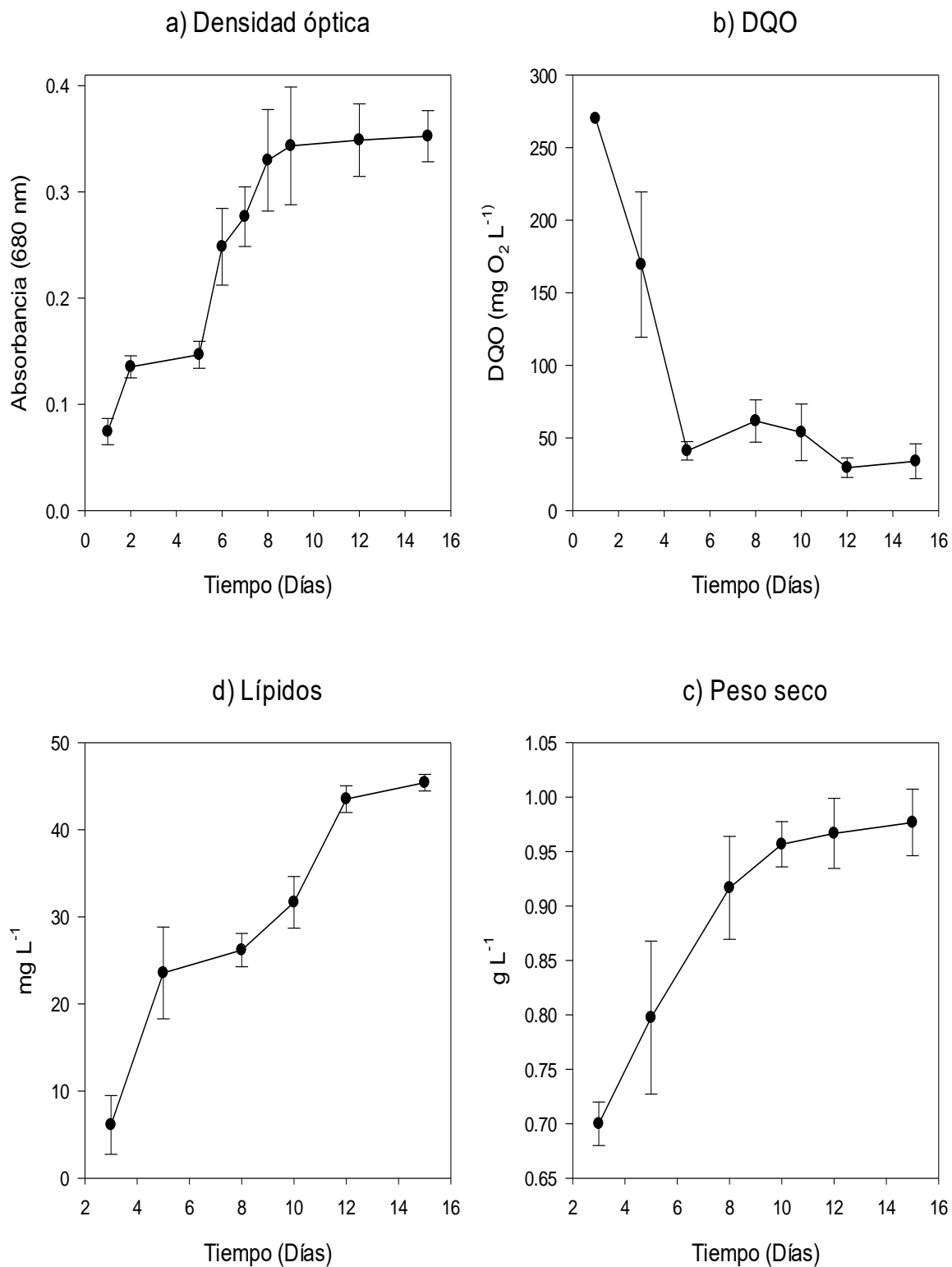


Figura 23. Perfil de remoción en los cultivos de *T. chui-N. oculata*. a) Densidad óptica, b) Lípidos, c) Peso seco, d) Demanda Química de Oxígeno

## 6.7 Cultivo *Dunaliella sp.*- *Tetraselmis chui*.

Los resultados del cultivo de la mezcla de microalgas *Dunaliella sp.*- *Tetraselmis chui* se muestran en las tablas 53-60 y figuras 24-25. El monitoreo de ortofosfatos (Tabla 53 y Figura 24b) mostró una concentración final 100% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de  $1.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . No obstante, es necesario mencionar que el día cinco de cultivo se registró una remoción del 88.8% y a partir de ese día el  $\text{PO}_4$  se mantuvo por debajo de  $1.7 \text{ mg L}^{-1}$  (90% inicial).

Tabla 53. Concentración de ortofosfatos en el cultivo *Dunaliella sp.*- *T. chui*.

Días	Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	3.7	3.8	3.8	3.8	0.0
5	1.7	1.7	1.8	1.7	0.1
8	0.7	1.1	0.9	0.9	0.2
10	1.3	0.8	1.3	1.1	0.3
12	0.4	0.2	0.4	0.3	0.1
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

La Tabla 54 y Figura 24a muestra los resultados del monitoreo de  $\text{NH}_4$  en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *T. chui*. La concentración final de este compuesto fue 85.4% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de  $6.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Es necesario destacar que al octavo día de cultivo se registró una eliminación del 83.4% de  $\text{NH}_4$  en el medio. De igual forma hay que resaltar que las concentraciones registradas el día diez de cultivo, tuvieron un aumento con respecto al día inmediato anterior de monitoreo.

Tabla 54. Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*.

<b>Nitrógeno amoniacal (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
<b>3</b>	70.6	72.5	73.8	72.3	1.6
<b>5</b>	35.3	36.2	36.9	36.1	0.8
<b>8</b>	15.4	21.5	17.7	18.2	3.1
<b>10</b>	19.9	20.7	21.9	20.9	1.0
<b>12</b>	20.3	20.9	20.5	20.6	0.3
<b>15</b>	17.7	17.0	13.4	16.0	2.3

La Tabla 55 y Figura 24d resumen los resultados del monitoreo de nitritos en el cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*. Este parámetro tuvo una concentración final 59.1% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción 0.3 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Para este compuesto se puede mencionar que el día ocho de cultivo se registró un leve aumento en la concentración promedio con respecto al punto anterior de monitoreo.

Tabla 55. Concentración de nitritos en el en el cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*.

<b>Nitritos (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
<b>3</b>	6.7	6.2	6.4	6.5	0.3
<b>5</b>	5.0	5.8	5.1	5.3	0.5
<b>8</b>	5.4	5.4	5.2	5.3	0.1
<b>10</b>	4.9	4.6	4.1	4.5	0.4
<b>12</b>	3.7	3.4	3.6	3.6	0.2
<b>15</b>	2.8	2.8	3.7	3.1	0.5

En la Tabla 56 y Figura 24c muestran los resultados del monitoreo de NO<sub>3</sub> en los cultivos *Dunaliella sp.- T. chui*. Este compuesto mostró una disminución del 100% al último día de monitoreo esto con una cinética de remoción de 4.8 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, de igual forma se puede mencionar que a partir del día 10 de cultivo se alcanzaron concentraciones por debajo de 7.3 mg L<sup>-1</sup>, lo que representa una disminución del 90% a la concentración inicial.

Tabla 56. Concentración de nitratos en el cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*.

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )			Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3		
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	43.2	45.3	49.3	45.9	3.1
5	25.1	26.9	29.2	27.1	2.0
8	17.1	15.7	13.4	15.4	1.9
10	8.0	2.0	5.2	5.1	3.0
12	7.5	1.2	8.2	5.7	3.9
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

En la Tabla 57 y Figura 25a muestran los resultados del monitoreo de lípidos en biomasa para los cultivos de *Dunaliella sp.- T. chui*. La productividad de estos compuestos fue de 4.7 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Se puede mencionar que entre los días 10-15 de cultivo se registró un aumento del 64.3% en la concentración lípidos, por lo que este periodo fue el de mayor productividad con un promedio de 9.2 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>.

Tabla 57. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*.

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )			Promedio	Desviación estándar
	R1	R2	R3		
3	0.5	0.7	2.0	1.1	0.8
5	2.3	3.4	4.8	3.5	1.2
8	8.0	8.5	6.7	7.7	1.0
10	27.4	24.7	24.5	25.5	1.6
12	41.7	29.6	31.7	34.4	6.5
15	75.2	65.2	74.6	71.7	5.6

En la Tabla 58 y Figura 25a se resumen los resultados del monitoreo de densidad óptica. Con estos datos se aprecia los cultivos alcanzaron la fase estacionaria entre los días 4-8 de cultivo. Sin embargo, el día 15 de cultivo se registró un aumento considerable en la densidad óptica promedio.

Tabla 58. Densidad óptica del cultivo *Dunaliella sp.- T. chui*.

<b>Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	0.103	0.108	0.109	0.107	0.012
<b>2</b>	0.207	0.192	0.304	0.234	0.061
<b>3</b>	0.335	0.308	0.339	0.327	0.017
<b>4</b>	0.463	0.359	0.461	0.428	0.059
<b>8</b>	0.492	0.365	0.497	0.451	0.075
<b>10</b>	0.476	0.348	0.497	0.440	0.081
<b>12</b>	0.557	0.512	0.421	0.497	0.069
<b>15</b>	0.676	0.512	0.417	0.535	0.131

La Tabla 59 y Figura 25b muestran los resultados del registro de peso seco en los experimentos de *Dunaliella sp.- T. chui*. El peso seco de la biomasa algal tuvo una productividad de 25.5 mg L<sup>-1</sup> Día. Asimismo, se puede mencionar que sólo uno de los cultivos del triplicado alcanzó una biomasa seca por arriba de 1 g L<sup>-1</sup>. La tasa específica de crecimiento de estos cultivos fue de 0.04 Día<sup>-1</sup>.

Tabla 59. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Dunaliella sp.- T. chui*

<b>Peso seco (g L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Días</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>3</b>	0.7	0.6	0.7	0.7	0.1
<b>5</b>	0.7	0.8	0.8	0.8	0.0
<b>8</b>	0.8	0.9	0.8	0.8	0.0
<b>10</b>	0.8	0.9	0.9	0.9	0.0
<b>12</b>	0.9	1.0	0.9	0.9	0.1
<b>15</b>	0.9	1.0	1.0	1.0	0.1

Los resultados del monitoreo de la demanda química de oxígeno se muestran en la Tabla 60 y Figura 25c. Este parámetro tuvo una disminución del 100% al final del experimento, con registros por debajo del límite de detección a partir del día 12, lo anterior con una cinética de remoción de 18 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Durante los primeros cinco días del experimento se registró una disminución promedio del 75.5% de la DQO, esto con una cinética de remoción de 13.6 mg L<sup>-1</sup> Día.

Tabla 60. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *T. chui*.

Días	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )			Promedio	Desviación Estándar
	R1	R2	R3		
1	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
3	215.0	251.7	231.7	232.8	18.4
5	45.0	81.7	71.7	66.1	19.0
8	38.3	35.0	61.7	45.0	14.5
10	41.7	15.0	28.3	28.3	13.3
12	15.0	1.7	DLD	5.6	8.2
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

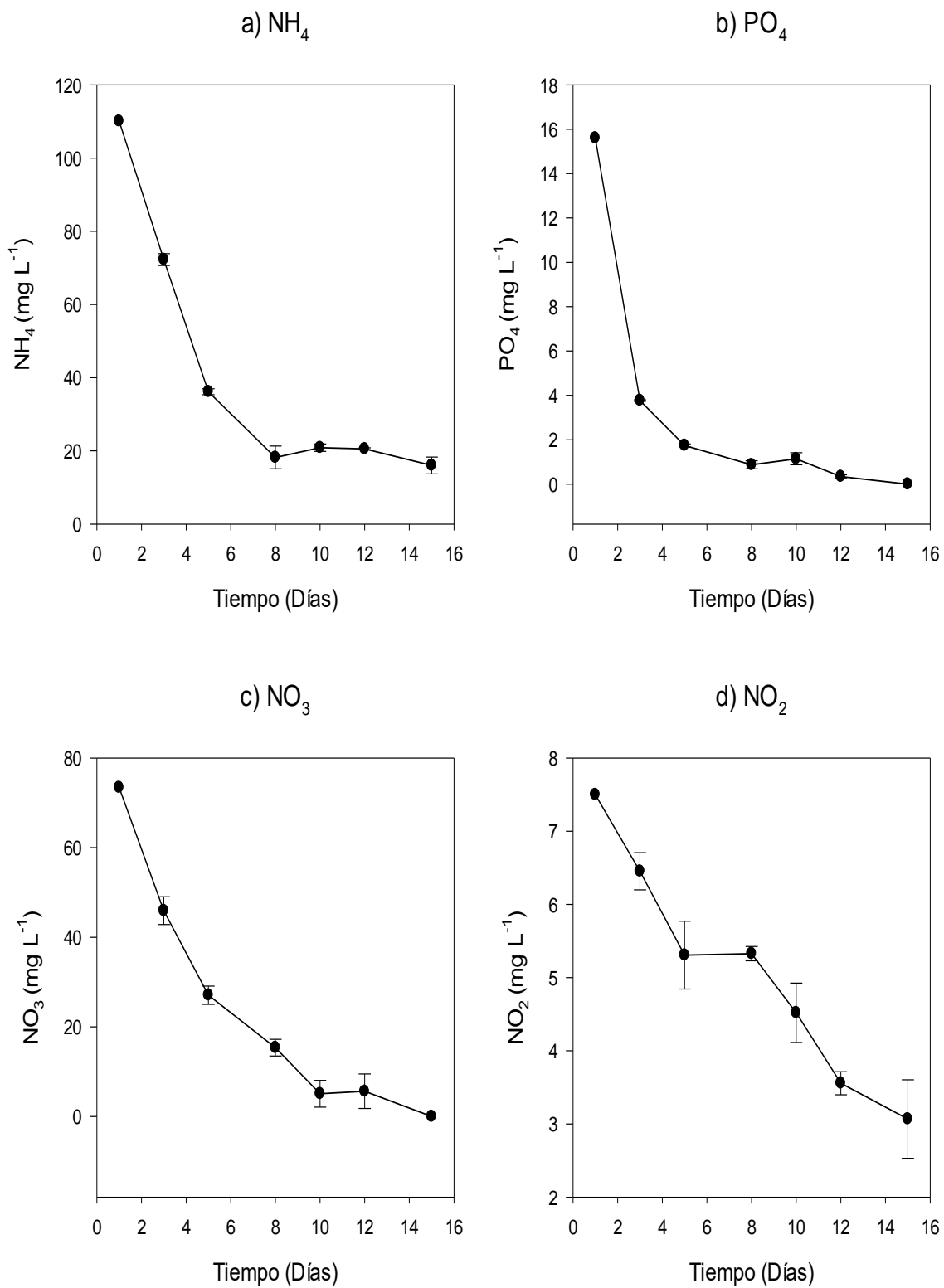


Figura 24. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *T. chui*. a) Amonio, b) Ortofosfatos, c) Nitratos, d) Nitritos.

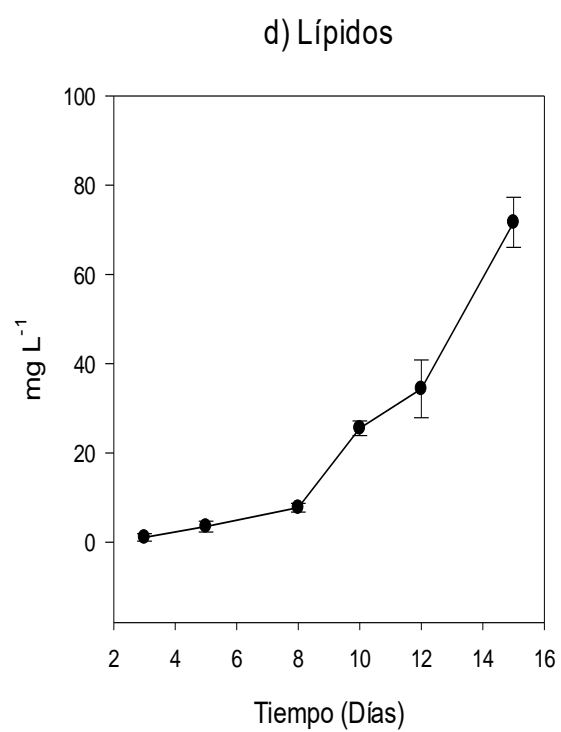
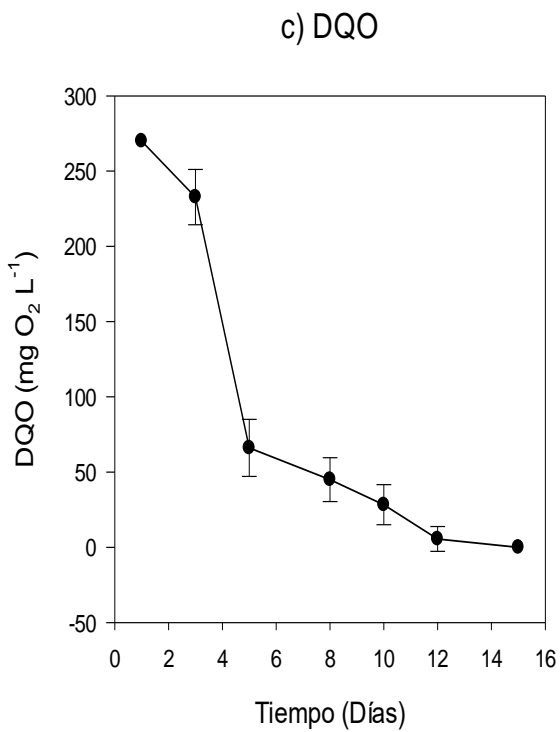
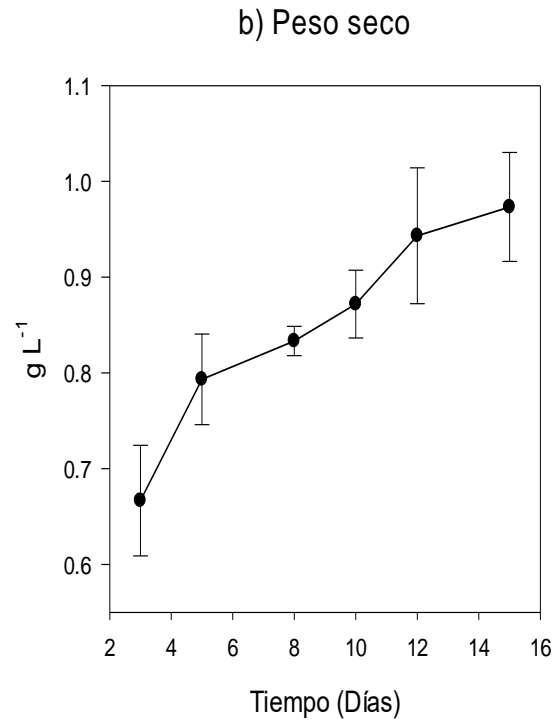
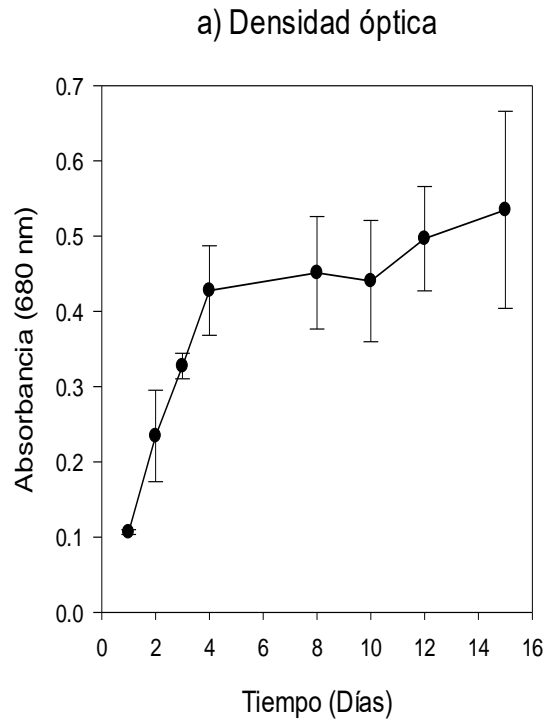


Figura 25. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *T. chui*. a) Densidad óptica, b) Peso seco, c) Demanda Química de Oxígeno, d) Lípidos



## 6.8 Cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Los registros del monitoreo del cultivo de la mezcla de microalgas *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui* se muestran en las tablas 61-70. En la Tabla 61 y Figura 26d se pueden observar los datos correspondientes a PO<sub>4</sub>, la concentración final de este parametro fue 92.6% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción de 0.96 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>.

Tabla 61. Concentración de ortofosfatos en el cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*.

Días	Ortofosfatos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	15.6	15.6	15.6	15.6	0.0
3	7.2	7.4	7.4	7.3	0.1
5	5.4	4.9	4.1	4.8	0.6
8	4.1	4.0	3.7	3.9	0.2
10	1.1	0.9	0.9	1.0	0.2
12	2.4	2.4	2.1	2.3	0.2
15	1.8	1.3	0.2	1.1	0.8

La Tabla 62 y Figura 26a muestran los resultados del monitoreo de NH<sub>4</sub>. Este compuesto tuvo una concentración final 90.3% menor a la inicial con una cinética de remoción fue de 6 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Entre los días 8-10 se registró un ligero aumento en la concentración de este parámetro.

Tabla 62. Concentración de nitrógeno amoniacal en el cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	Nitrógeno amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	110.1	110.1	110.1	110.1	0.0
3	44.9	47.1	34.8	42.3	6.6
5	33.7	38.8	41.7	38.1	4.1
8	25.8	27.5	24.9	26.1	1.4
10	25.5	25.8	30.4	27.2	2.7
12	17.5	23.0	24.5	21.7	3.7
15	13.1	7.3	11.4	10.6	3.0

Los resultados para el registro de NO<sub>2</sub> en el cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui* (Tabla 63; Figura 26b) muestran que la concentración final de este compuesto fue 45.9% menor a la inicial, esto con una cinética de remoción 0.2 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>. Las desviaciones estándar de las concentraciones de este compuesto sugieren que entre los días 8-10 no hubo una reducción considerable.

Tabla 63. Concentración de nitritos en el en el cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*-*T. chui*

Días	Nitritos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	7.5	7.5	7.5	7.5	0.0
3	5.9	5.9	5.8	5.9	0.0
5	6.1	2.6	6.7	5.1	2.2
8	5.8	2.6	6.1	4.8	1.9
10	5.9	6.7	2.2	4.9	2.4
12	5.1	2.2	6.5	4.6	2.2
15	6.3	2.7	3.2	4.1	1.9

La Tabla 64 y Figura 26c muestran los resultados del monitoreo de NO<sub>3</sub>. El cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui* disminuyó en 100% la concentración inicial de este compuesto. Los primeros cinco días del experimento tuvieron una cinética de remoción de 18.6 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, lo que dio como resultado una reducción del 92.9% de la concentración inicial. De igual forma se puede resaltar que a partir del día diez de cultivo comenzaron a registrarse concentraciones por debajo del límite de detección.

Tabla 64. Concentración de nitratos en el cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	73.4	73.4	73.4	73.4	0.0
3	21.8	24.9	29.4	25.3	3.8
5	9.6	4.9	1.1	5.2	4.3
8	13.5	12.9	13.6	13.3	0.4
10	DLD	5.6	DLD	1.9	3.3
12	4.2	DLD	DLD	1.4	2.5
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

La Tabla 65 y Figura 27c muestran el registro de la concentración de lípidos en biomasa de este experimento. La productividad para estas biomoléculas fue de 4.04 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>, sin embargo, entre los días 8 y 10 se observó una productividad de 9.4 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>.

Tabla 65. Concentración de lípidos en la biomasa del cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	Lípidos (mg L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>3</b>	1.3	1.7	4.0	2.3	1.4
<b>5</b>	7.2	5.6	6.1	6.3	0.8
<b>8</b>	9.6	4.6	7.4	7.2	2.5
<b>10</b>	24.7	28.0	25.3	26.0	1.7
<b>12</b>	43.9	42.5	36.3	40.9	4.0
<b>15</b>	49.8	58.7	44.2	50.9	7.3

La densidad óptica de los cultivos de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui* (Tabla 66; Figura 27a) muestra que estos alcanzaron su fase estacionaria aproximadamente al sexto día del experimento. La mayor densidad óptica promedio se registró el último día de monitoreo.

Tabla 66. Densidad óptica del cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	Densidad Óptica (Absorbancia 680 nm)				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
<b>1</b>	0.084	0.093	0.108	0.095	0.012
<b>2</b>	0.102	0.103	0.106	0.104	0.002
<b>3</b>	0.125	0.127	0.148	0.133	0.013
<b>4</b>	0.166	0.173	0.165	0.168	0.004
<b>8</b>	0.193	0.225	0.217	0.212	0.017
<b>10</b>	0.190	0.224	0.227	0.214	0.021
<b>12</b>	0.232	0.283	0.245	0.253	0.027
<b>15</b>	0.219	0.306	0.277	0.267	0.044

El peso seco de la biomasa (Tabla 67; Figura 27d) tuvo una productividad promedio de 16.6 g L<sup>-1</sup> Día, con estos datos se observó que los cultivos alcanzaron su fase estacionaria el día 12 de cultivo. La tasa específica de crecimiento de estos cultivos fue de 0.03 Día<sup>-1</sup>.

Tabla 67. Peso seco de la biomasa en los cultivos de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	Peso seco (g L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
3	0.57	0.58	0.57	0.573	0.006
5	0.63	0.59	0.62	0.613	0.021
8	0.65	0.66	0.63	0.646	0.015
10	0.65	0.76	0.74	0.717	0.059
12	0.79	0.72	0.78	0.762	0.036
15	0.81	0.75	0.76	0.773	0.032

Los datos del monitoreo de la DQO se muestran en la Tabla 68 y Figura 27b. Este parámetro tuvo una reducción del 100% con respecto a la concentración inicial, los primeros tres días del monitoreo tuvieron una cinética de remoción de 18.6 mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup> con una disminución del 90.3% inicial.

Tabla 68. Demanda química de oxígeno en el medio de cultivo de *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

Días	DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )				
	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
1	270.0	270.0	270.0	270.0	0.0
3	38.3	21.7	41.7	33.9	10.7
5	31.7	21.7	25.0	26.1	5.1
8	15.0	21.7	DLD	12.2	11.1
10	21.7	DLD	DLD	7.2	12.5
12	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD
15	DLD	DLD	DLD	DLD	DLD

DLD: Debajo del límite de detección.

Los datos del monitoreo de clorofila se muestran en la Tabla 69 y Figura 28a, este registro muestra una estimación de la biomasa algal y por ende una cinética de crecimiento. Con este parámetro se logró observar que los cultivos del experimento alcanzan su fase estacionaria aproximadamente al décimo día cultivo. El último día de cultivo se apreció una leve disminución en la concentración tanto de clorofila  $\alpha$  como  $\beta$ .

Tabla 69. Concentración de clorofila en la biomasa del cultivo *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

<b>Clorofila (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>					
	Promedio C $\alpha$	DE C $\alpha$	Promedio C $\beta$	DE C $\beta$	C $\alpha$ + C $\beta$ ( $\mu\text{g mL}$ )
<b>1</b>	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2
<b>3</b>	2.0	0.1	1.3	0.7	3.3
<b>5</b>	3.5	0.7	1.6	0.4	5.1
<b>8</b>	4.4	0.2	2.5	0.2	7.0
<b>10</b>	6.0	0.1	3.8	0.4	9.8
<b>12</b>	7.0	0.8	4.5	0.6	11.4
<b>15</b>	6.9	0.5	4.0	0.4	10.9

C $\alpha$ : Clorofila  $\alpha$ , C $\beta$ : Clorofila  $\beta$

La Tabla 70 y Figura 28b muestran los resultados del conteo celular, se puede observar cómo *N. oculata* fue la microalga que tuvo mayor presencia durante todo el experimento.

Tabla 70. Conteo celular *Dunaliella* sp.- *N. oculata*- *T. chui*

	<b><i>T. chui</i></b>	<b><i>Dunaliella</i> sp.</b>	<b><i>N. oculata</i></b>
<b>3</b>	4.11E+04	2.25E+05	2.78E+05
<b>5</b>	8.70E+04	2.60E+05	4.27E+05
<b>8</b>	1.50E+05	3.51E+05	9.00E+05
<b>10</b>	9.54E+04	5.71E+05	1.17E+06
<b>12</b>	9.33E+04	7.88E+05	1.48E+06
<b>15</b>	1.00E+05	8.10E+05	1.30E+06

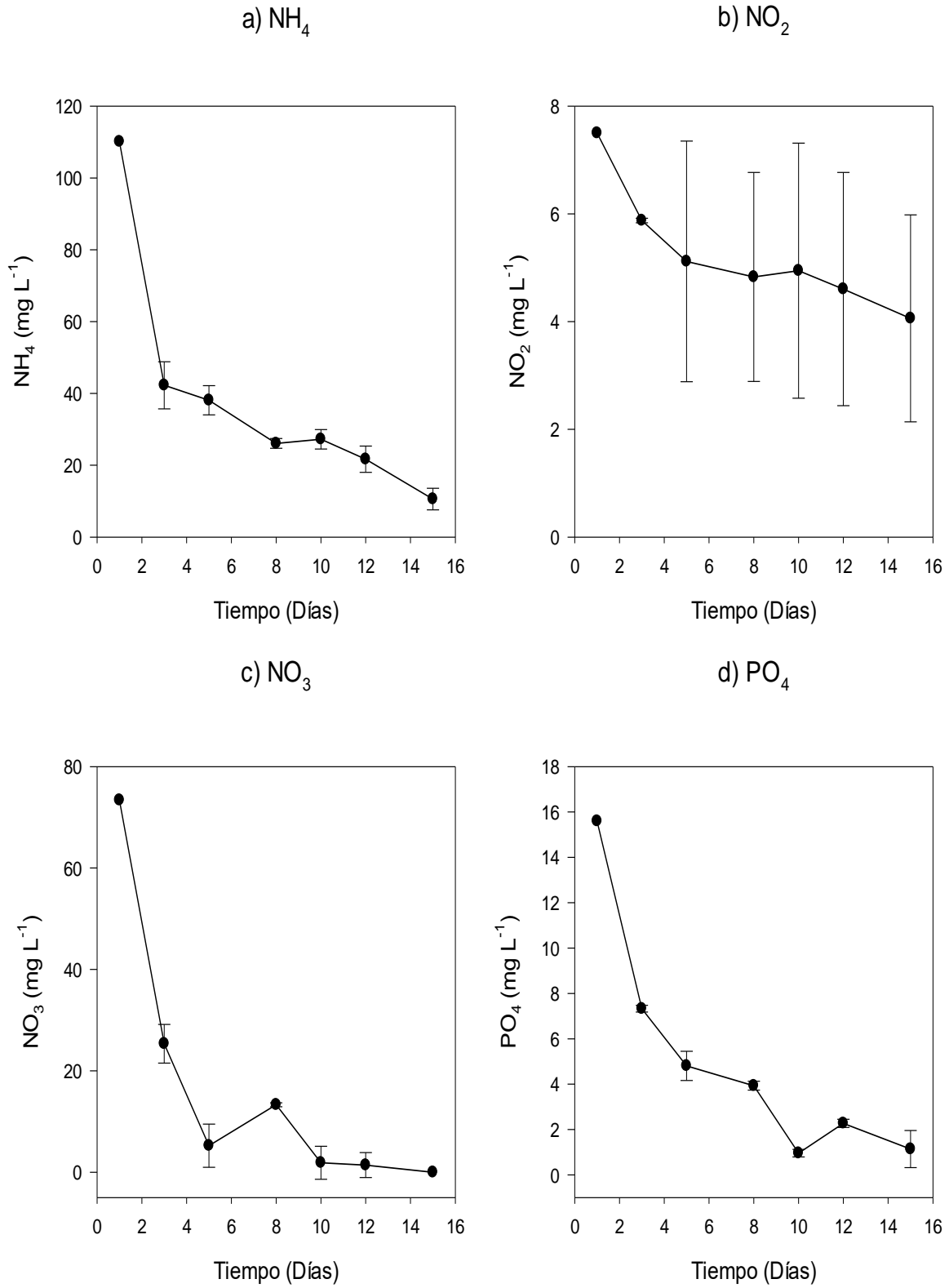


Figura 26. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *N. oculata*-*T. chui*. a) Amonio, b) Nitritos, c) Nitratos, d) Ortofosfatos

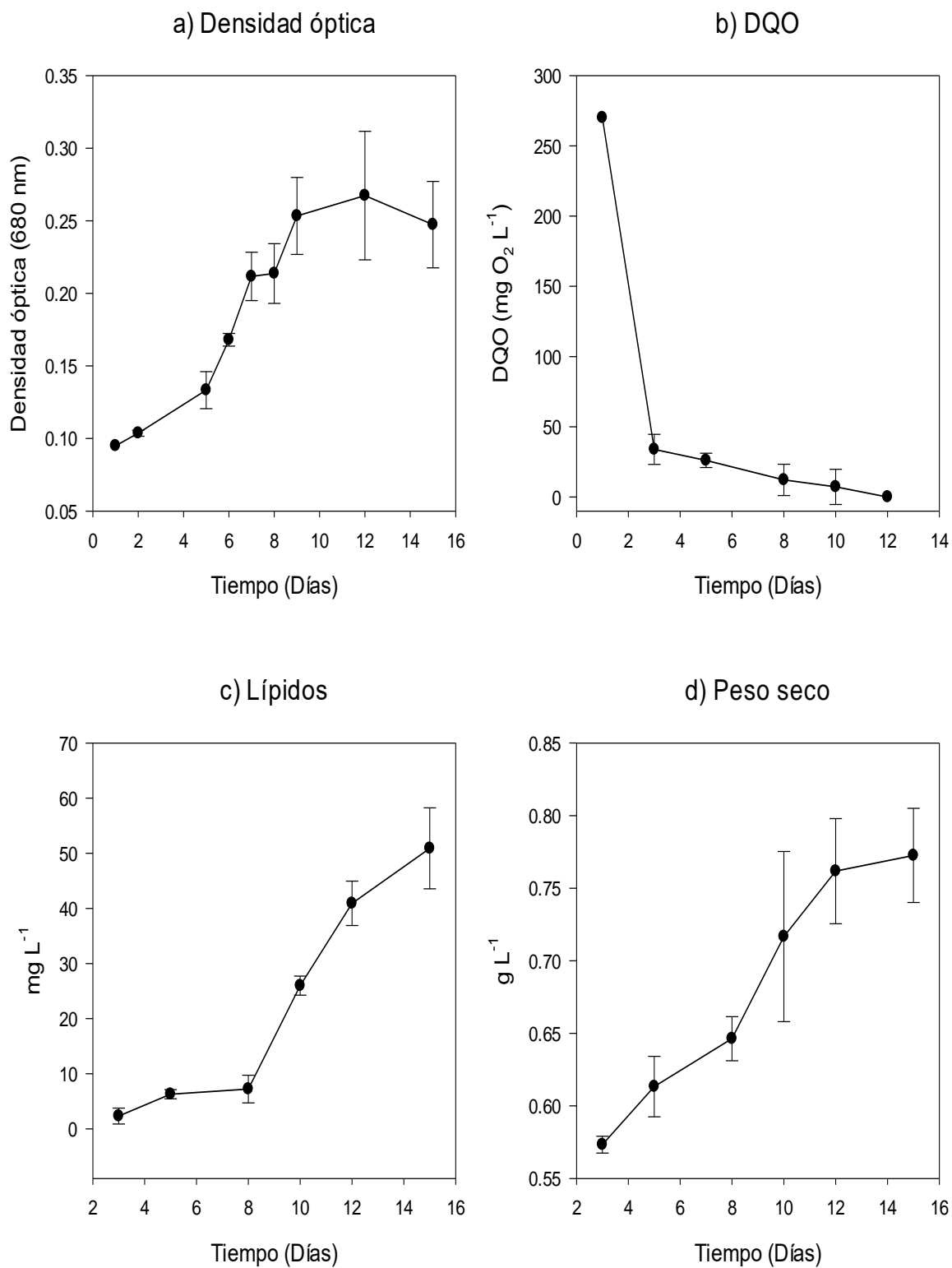


Figura 27. Perfil de remoción en los cultivos de *Dunaliella sp.*- *N. oculata*-*T. chui*. a) Densidad óptica, b) Demanda Química de Oxígeno, c) Lípidos, d) Peso seco

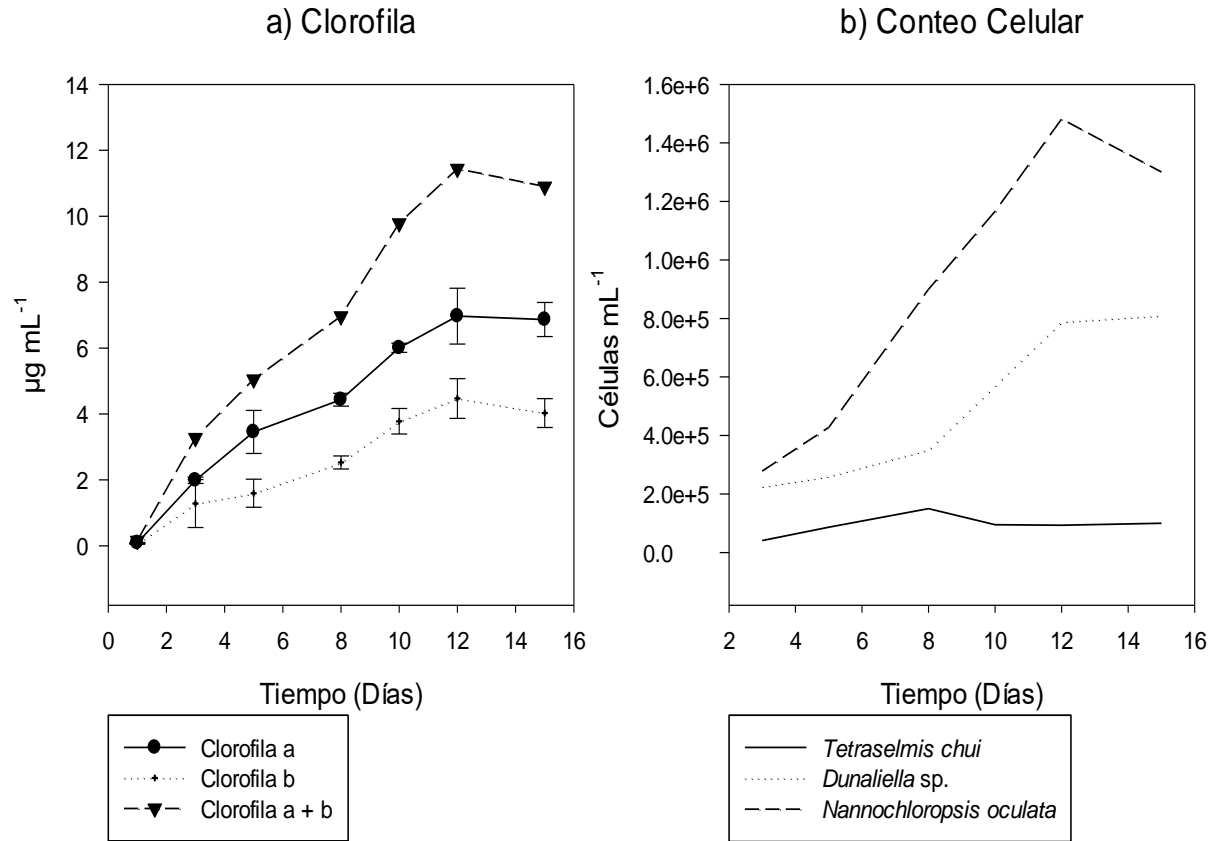


Figura 28. Perfil de los cultivos de *Dunaliella sp.*- *N. oculata*-*T. chui*. a) Clorofila b) Conteo celular



## VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Para facilitar el manejo de los datos tanto en el software estadístico como en las tablas y figuras, se optó por abreviar en nombre de los cultivos utilizando sólo las iniciales de las microalgas cultivadas durante cada experimento (Tabla 71).

Tabla 71. Abreviaturas para los cultivos

Cultivo	Abreviatura
Control	C
Concentración inicial	I
<i>Dunaliella</i> sp.	D
<i>Tetraselmis chui</i>	T
<i>Nannochloropsis oculata</i>	N
<i>Dunaliella</i> sp.- <i>Nannochloropsis oculata</i>	D+N
<i>Tetraselmis chui</i> - <i>Nannochloropsis oculata</i>	T+N
<i>Dunaliella</i> sp.- <i>Tetraselmis chui</i>	D+T
<i>Dunaliella</i> sp.- <i>Tetraselmis chui</i> - <i>Nannochloropsis oculata</i>	D+N+T

### 7.1 Ortofosfatos

Para el análisis de los datos de ortofosfatos, en primer lugar, fueron comparadas mediante una prueba de ANOVA las concentraciones finales (día 15) registradas en cada cultivo para buscar si existían diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre estas. Los resultados de esta prueba (Tabla 72), mostraron que las concentraciones finales de  $PO_4$  de al menos uno de los cultivos eran diferentes.

Tabla 72. Estadísticos de ANOVA para el  $PO_4$  día 15.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	936.3	117.04	1233.9	< 2.20E-16	La concentración final de $PO_4$ de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	1.7	0.095			
<b><math>\alpha=0.05</math></b>						

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó la prueba post hoc *Student–Newman–Keuls* (SNK), para detectar cuales eran los cultivos diferentes, los estadísticos resultantes de esta prueba se muestran en la Tabla 73 y Figura 29.

El SNK mostró en primer lugar, que existían diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las concentraciones finales de  $\text{PO}_4$  del experimento control y las concentraciones iniciales, lo que quiere decir que la reducción de 12.62% de la concentración de  $\text{PO}_4$  producida por el método experimental no puede ser atribuida al cultivo de las microalgas.

Por otro lado, no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las concentraciones finales de  $\text{PO}_4$  de los cultivos D, D+N, D+T, T, T+N (Tabla 73; Figura 29) los cuales tuvieron un porcentaje de remoción de 98.7%, 100%, 100%, 98.6%, 100% respectivamente, siendo estos los más altos registrados durante el experimento.

Dado lo anterior, se procedió a comparar las concentraciones de  $\text{PO}_4$  con el paso de los días dependiendo cada cultivo. Para ello se efectuó una prueba de ANCOVA, la cual es un homólogo de la prueba de ANOVA pero para datos donde al menos una variable explicativa es continua (en este caso los días de monitoreo). Los estadísticos de esta prueba se muestran en la Tabla Anexo 1.

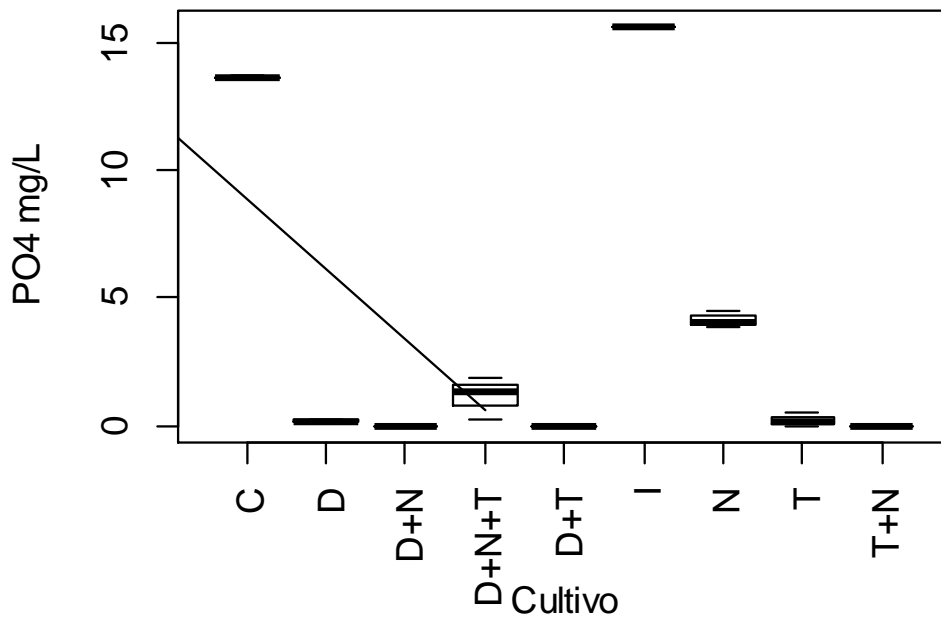


Figura 29. Concentraciones finales de  $\text{PO}_4$  por cultivo.

Tabla 73. Student-Newman-Keuls test para PO<sub>4</sub> Día 15.

Tratamientos	D+N	D+T	T+N	D	T	D+N+T	N	C	I
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% de remoción</b>	100%	100%	100%	98.7%	98.6%	92.6%	73.5%	12.6%	
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 **	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 ns	6-2 **	7-3 ***	8-4 ***	9-5 ***				
<b>4</b>	4-1 ns	5-2 ns	6-3 **	7-4 ***	8-5 ***	9-6 ***			
<b>3</b>	3-1 ns	4-2 ns	5-3 ns	6-4 **	7-5 ***	8-6 ***	9-7 ***		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 ns	4-3 ns	5-4 ns	6-5 **	7-6 ***	8-7 ***	9-8 ***	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

Tabla 74. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de PO<sub>4</sub> en función de los días y cultivo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
<b>Días</b>	1	180.2	180.2	292.1	< 2.2e-16 ***	La concentración de PO <sub>4</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo
<b>Cultivo</b>	8	321.2	40.1	65	< 2.2e-16 ***	La concentración de PO <sub>4</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
<b>Interacción Días: Cultivo</b>	8	85.8	10.7	17.3	< 2.2e-16 ***	La concentración de PO <sub>4</sub> a lo largo de los días, es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
<b>Residuales</b>	171	105.5	0.6			

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

El ANCOVA es una prueba estadística que crea modelos lineales (o regresiones lineales) a partir de los datos previamente transformados mediante logaritmos naturales. Posteriormente, este análisis contrasta la existencia de diferencias significativas entre las pendientes e interceptos de cada modelo. La presencia de diferencias estadísticamente significativas sugirió que los tratamientos (en este caso los cultivos) afectaron de manera diferente las concentraciones de fosfatos a lo largo de los días. Esto cual puede observarse gráficamente como líneas de regresión con diferente pendiente e intersección (Figura 30). La comparación estadística mediante

pruebas de T de los modelos lineales confirmó que existen diferencias significativas entre las pendientes de algunos modelos, sin embargo, este análisis pierde robustez dado que las  $R^2$  de varios de los modelos lineales es baja. Los datos de estos contrastes se muestran en la Tabla Anexo 1.

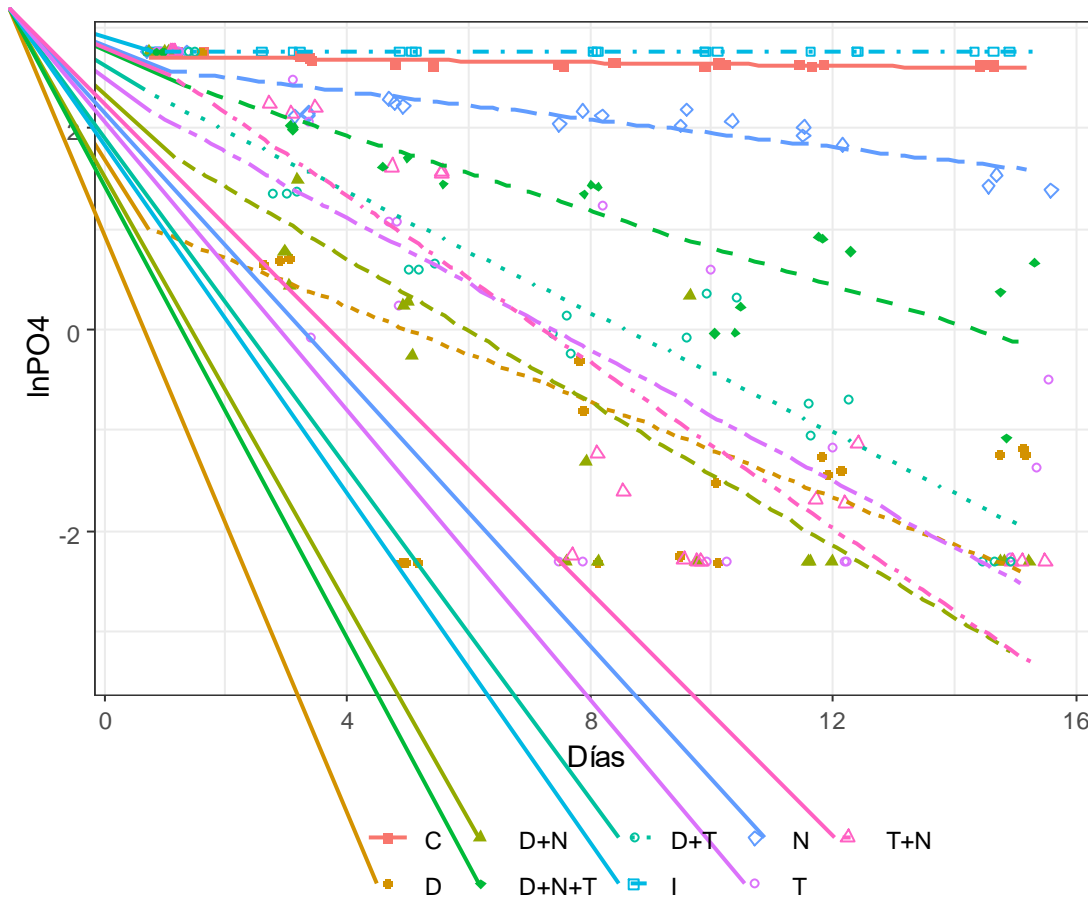


Figura 30. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de  $PO_4$ .

Por otro lado, la prueba de ANCOVA resaltó que las concentraciones de fosfatos a lo largo de los días cambiaron en función del cultivo, esto resulta evidente si se observa la Figura 29, donde, aunque podemos ver que los cultivos D, D+N, D+T, T, T+N alcanzaron concentraciones similares al final, su comportamiento fue distinto a lo largo del experimento.

Para el caso de la remoción de  $PO_4$ , el cultivo monoespecífico D y los co-cultivos D+N, D+T, T, T+N fueron los que tuvieron el mejor comportamiento al final del

experimento, ya que estos mostraron un porcentaje de remoción de entre el 98.6-100% y no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales.

Sin embargo, es necesario resaltar el caso del cultivo D, ya que este logró el mejor porcentaje de remoción en un menor tiempo, puesto que alcanzó un porcentaje de remoción del 100% al día cinco del experimento, siendo que el resto de los cultivos que alcanzaron porcentajes de remoción similares (D+N, D+T, T, T+N) lo hicieron al menos hasta el día 12 de experimento.

Se puede señalar adicionalmente que *Dunaliella* sp. estuvo presente en dos de los tres cultivos con mayor porcentaje de remoción (D+N, D+T).

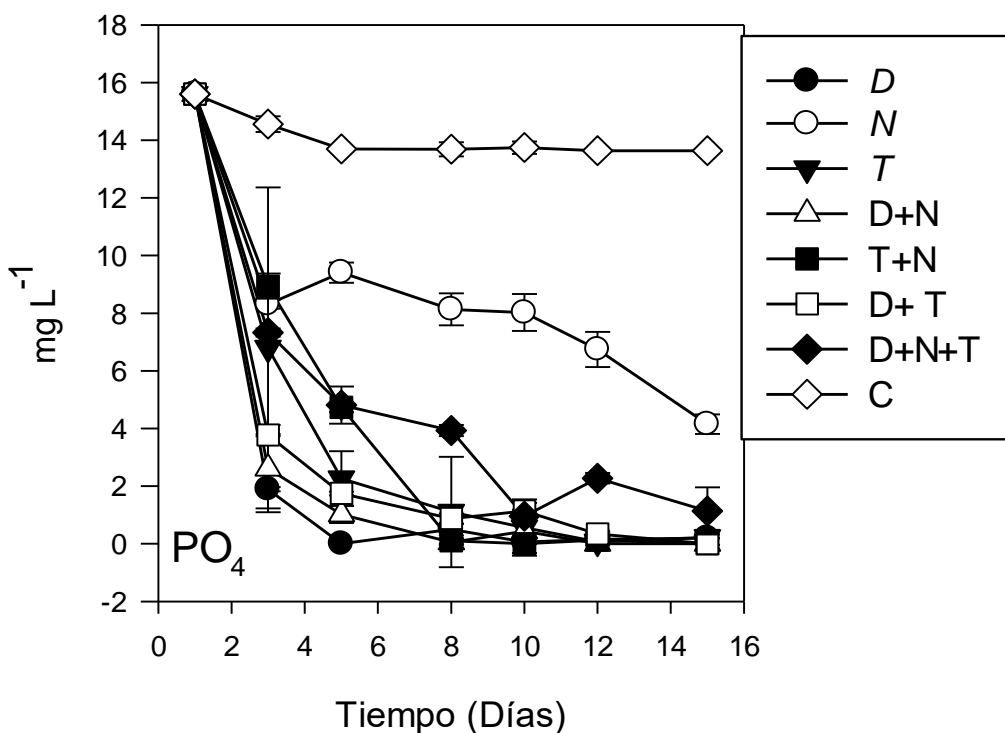


Figura 31.  $PO_4$  en función del tiempo.

## 7.2 Amonio

De igual manera que con los ortofosfatos, se compararon las concentraciones finales de  $NH_4$  mediante un ensayo ANOVA, los estadísticos resultantes se muestran en la Tabla 75.

Tabla 75. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NH<sub>4</sub>.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	44371	5546.4	569.9	< 2.2e-16	La concentración final de NH <sub>4</sub> de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	175	9.7			

$\alpha=0.05$

El valor de p arrojado por esta prueba indicó que al menos uno de los cultivos tuvo una concentración final estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) a los demás, por lo que se procedió a realizar comparaciones post Hoc mediante SNK.

Los resultados del SNK para NH<sub>4</sub>, se muestran en la Tabla 76, este análisis mostró que la concentración final de amonio del experimento control fue significativamente distinta ( $\alpha=0.05$ ) a las concentraciones iniciales, por lo que el 6.2% de disminución de NH<sub>4</sub> registrado en el experimento control no puede atribuirse al cultivo de microalgas.

Tabla 76. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NH<sub>4</sub> Día 15.

Tratamientos	T+N	D	N	D+N+T	D+T	D+N	T	C	I
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% de remoción</b>	100%	99.3%	95.7%	90.3%	85.4%	81.8%	75%	6.2%	
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 ***	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 ***	6-2 ***	7-3 ***	8-4 ***	9-5 ***				
<b>4</b>	4-1 **	5-2 ***	6-3 ***	7-4 ***	8-5 ***	9-6 ***			
<b>3</b>	3-1 ns	4-2 **	5-3 ***	6-4 **	7-5 **	8-6 ***	9-7 ***		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 ns	4-3 *	5-4 *	6-5 ns	7-6 *	8-7 ***	9-8 *	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

Se puede observar que el cultivo T+N, el cual tuvo el porcentaje de remoción más alto de NH<sub>4</sub> (100%) no mostró concentraciones finales estadísticamente diferentes a los cultivos D y N, los cuales tuvieron una disminución de 99.3% y 95.7%.

El tratamiento con el menor porcentaje de remoción del fue el cultivo T con un 75% y fue estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) a todos los demás (Figura 32).

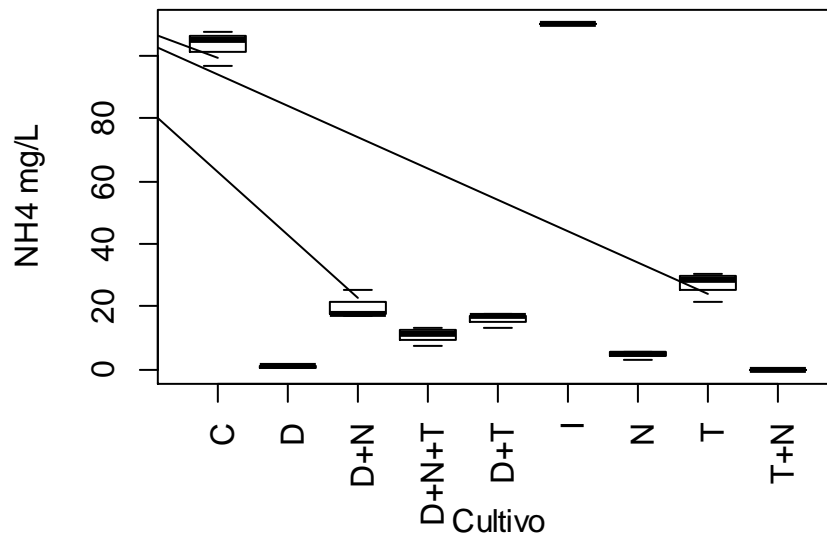


Figura 32. Concentraciones finales de NH<sub>4</sub> por cultivo.

Mediante una prueba de ANCOVA se buscaron diferencias en las concentraciones de NH<sub>4</sub> a lo largo de los días en función de los cultivos, los estadísticos se muestran en la Tabla 77.

El ANCOVA mostró que al menos un cultivo afectó la concentración de amonio de forma diferente a los demás a lo largo del tiempo, lo cual fue corroborado más adelante mediante la comparación de las pendientes de los modelos lineales que crea esta prueba. Es necesario puntualizar que las R<sup>2</sup> de varios de las regresiones fue mala y por lo tanto esto le resta robustez al análisis (Tabla Anexo 2).

En Figura 33 se observan los modelos lineales creados para la comparación del ANCOVA. Se aprecian las diferencias entre las pendientes de cada modelo y cómo el ajuste de algunos de ellos no fue demasiado alto, específicamente en el cultivo D+T.

Tabla 77. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NH<sub>4</sub> en función de los días y cultivo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
Días	1	122.782	122.7	113.2	< 2.2e-16	La concentración de NH <sub>4</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo.
Cultivo	8	290.8	36.3	33.5	< 2.2e-16	La concentración de NH <sub>4</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
Interacción Días: Cultivo	8	86.5	10.8	9.9	2.32E-11	La concentración de NH <sub>4</sub> a lo largo de los días, es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
<b>Residuales</b>						
Significancia: <0.001 '****' <0.01 '***' <0.05 '**' >0.05 'ns'						

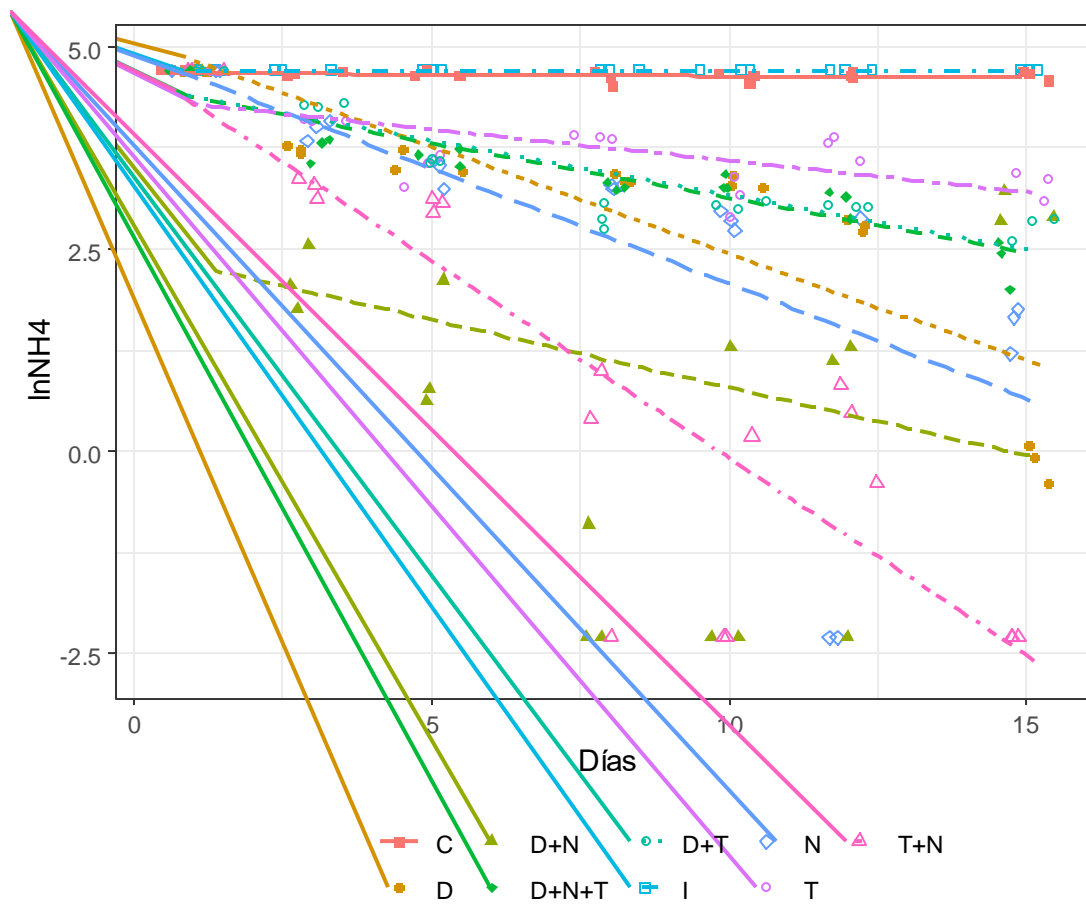


Figura 33. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de NH<sub>4</sub>.



En la Figura 32, se pueden observar gráficamente las diferencias en el comportamiento de la concentración de  $\text{NH}_4$  a lo largo de los días en función del cultivo. Se aprecia que el tratamiento que alcanza el mejor porcentaje de remoción en menor tiempo posible es el co-cultivo D+N, puesto que este co-cultivo logró remover el 95.4% del  $\text{NH}_4$  al tercer día de experimento, mientras que el resto de los cultivos alcanzan ese porcentaje de remoción al menos hasta el día ocho, siendo que algunos como el cultivo T no lograron ese porcentaje de disminución.

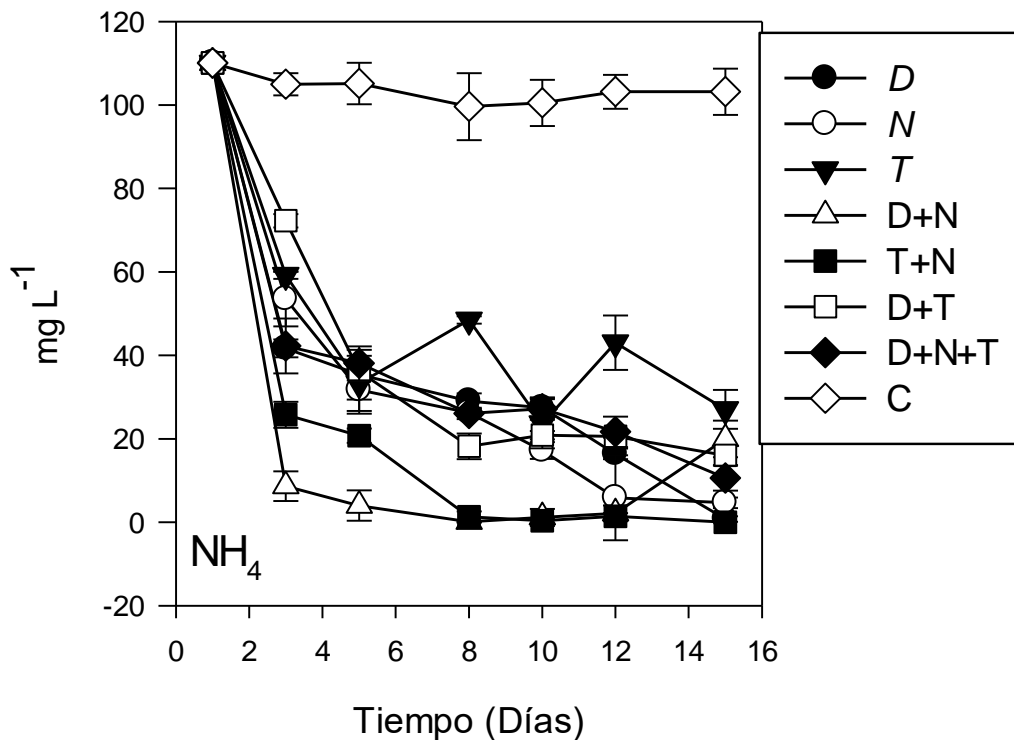


Figura 34.  $\text{NH}_4$  en función del tiempo.

En resumen, en cuestión del amonio, los mejores tratamientos al final del experimento fueron los cultivos D, T+N y N, los cuales tuvieron un porcentaje de remoción de 99.3%, 98.7% y 95.7% respectivamente. Sin embargo, el tratamiento que alcanzó el mejor porcentaje de remoción en menor tiempo es el co-cultivo, ya que este logró remover el 95.4% del  $\text{NH}_4$  durante los primeros tres días, aunque su porcentaje de remoción final fue solo 81.8%, lo que corresponde al sexto mejor tratamiento.

### 7.3 Nitritos

Los estadísticos resultantes del ANOVA para NO<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 78. Esta prueba mostró que la concentración final de nitritos en al menos uno de los cultivos fue significativamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) a las demás, por lo que se procedió a realizar la comparación post hoc SNK.

Tabla 78. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NO<sub>2</sub>.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	155.7	19.4	20.7	1.36E-07	La concentración final de NO <sub>2</sub> de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	16.8	0.9			

$\alpha=0.05$

El SNK para la concentración final de NO<sub>2</sub> (Tabla 79), señaló que existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la concentración inicial y el cultivo control, por lo que la disminución de NO<sub>2</sub> registrada en los experimentos no puede atribuirse totalmente al cultivo de las microalgas.

Tabla 79. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NO<sub>2</sub> Día 15.

Tratamientos	T+N	D+N	D+T	N	D+N+T	D	C	T	I
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% de remoción</b>	100%	67.3%	59.1%	52.8%	45.8%	25.6%	10.6%	1.4%	
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 ***	7-2 ***	8-3 ***	9-4 **					
<b>5</b>	5-1 ***	6-2 **	7-3 **	8-4 **	9-5 **				
<b>4</b>	4-1 **	5-2 ns	6-3 *	7-4 **	8-5 **	9-6 ns			
<b>3</b>	3-1 **	4-2 ns	5-3 ns	6-4 *	7-5 **	8-6 ns	9-7.**		
<b>2</b>	2-1 **	3-2 ns	4-3 ns	5-4 ns	6-5 ns	7-6 ns	8-7 ns	9-8 ns	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

Se resalta que el cultivo T+N, el cual tuvo el porcentaje de remoción más alto (100%; Figura 35), fue significativamente distinto ( $\alpha=0.05$ ) de los demás tratamientos, por lo que puede considerarse a este cultivo como el que tuvo el mejor desempeño. Esto, queda reforzado por el hecho de que ninguno de los demás tratamientos tuvo un porcentaje de remoción mayor al 70%.

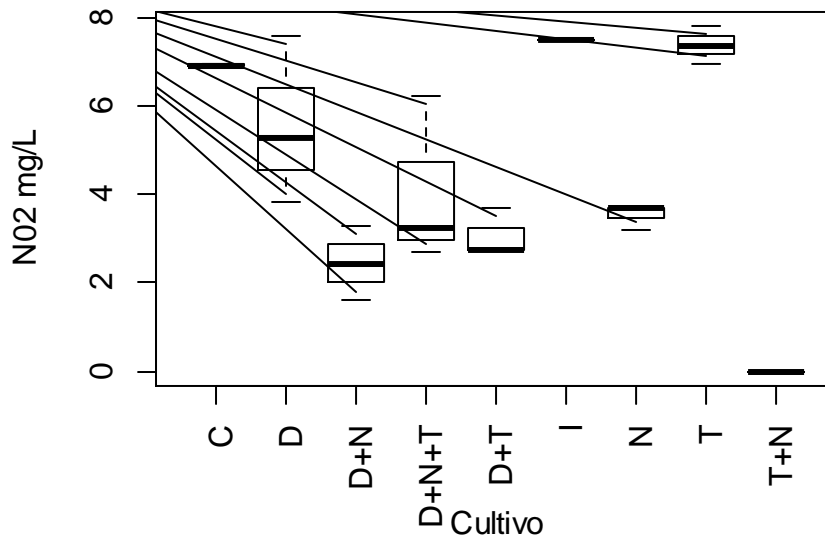


Figura 35. Concentraciones finales de NO<sub>2</sub> por cultivo.

Se realizó en análisis de ANCOVA (Tabla 80). Con este, se comprobó que el comportamiento de las concentraciones NO<sub>2</sub> a lo largo del experimento, fue diferente en al menos uno de los cultivos.

Tabla 80. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NO<sub>2</sub> en función de los días y cultivo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
<b>Días</b>	1	15.6	15.6	171.09	< 2.2e-16	La concentración de NO <sub>2</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo.
<b>Cultivo</b>	8	121.4	15.1	165.8	< 2.2e-16	La concentración de NO <sub>2</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
<b>Interacción Días: Cultivo</b>	8	36.8	4.6	50.3	< 2.2e-16	La concentración de NO <sub>2</sub> a lo largo de los días, es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
<b>Residuales</b>	171	15.6	0.09	171		
<b>Significancia: &lt;0.001 '****' &lt;0.01 '***' &lt;0.05 '**' &gt;0.05 'ns'</b>						

Los resultados del análisis de ANCOVA se muestran gráficamente en la Figura 36, en esos se nota que el cultivo T+N (el cual tuvo el porcentaje de remoción más alto), tuvo una pendiente negativa pronunciada, mientras que el resto de los tratamientos

muestran pendientes bajas. Es necesario mencionar que el ajuste de varios de los modelos lineales mostrados no fue demasiado alto, las comparaciones de las pendientes de tales modelos, así como las  $R^2$  e intersecciones se muestran en la Tabla Anexo 3.

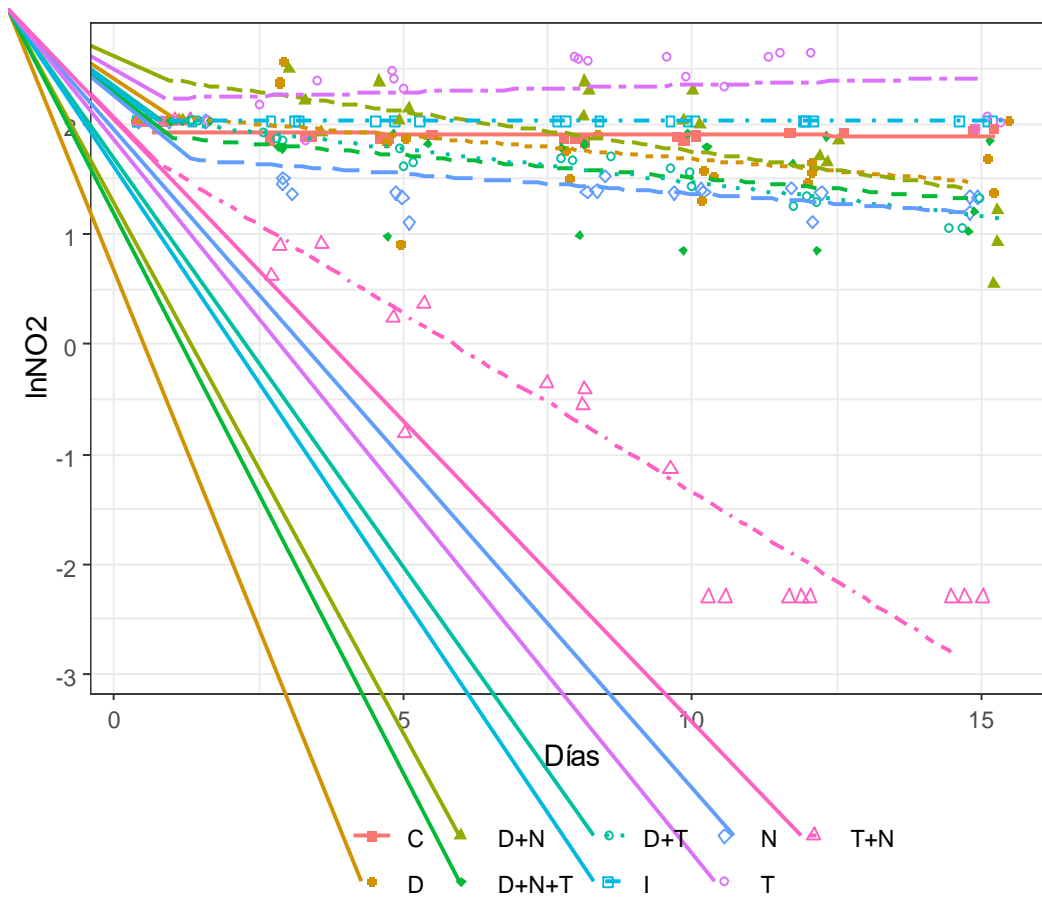


Figura 36. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de  $\text{NO}_2$ .

En la Figura 35, se observa que varios de los cultivos mostraron una tendencia positiva a lo largo del experimento por lo cual sus concentraciones de  $\text{NO}_2$  aumentaron con respecto a la concentración inicial (D, D+T y D+N). Esto también puede apreciarse en las pendientes de sus modelos de regresión, dado que estos cultivos mostraron pendientes negativas muy bajas o positivas.

De igual manera en la Figura 37 se puede apreciar que el cultivo T+N, fue el tratamiento que registró el mejor porcentaje de remoción en un menor tiempo, con una disminución del 87.2% en la concentración de  $\text{NO}_2$  durante los primeros cinco días del experimento, podemos mencionar que este porcentaje fue mayor que el porcentaje de remoción final del resto de los cultivos.

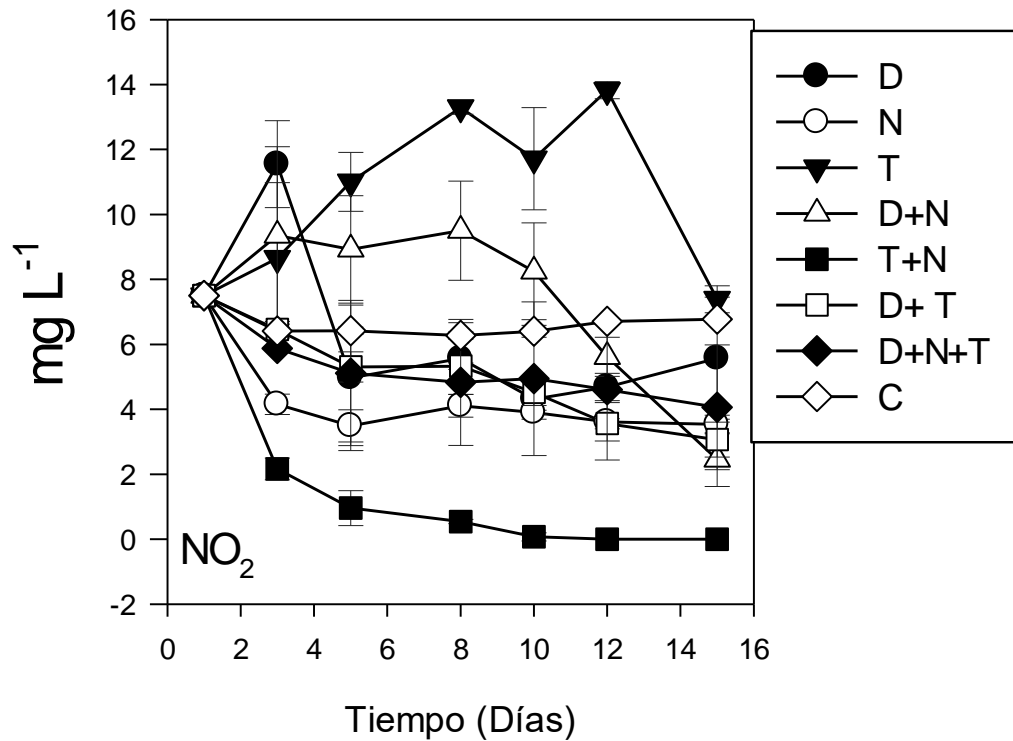


Figura 37. Concentración de nitritos en función del tiempo.

Como resumen de lo anterior, se puede decir que el cultivo T+N fue el tratamiento con mejor desempeño en cuanto a la disminución de  $\text{NO}_2$ , ya que este cultivo registró el mejor porcentaje de remoción al final del cultivo y fue el tratamiento que logró el mejor porcentaje de remoción en menor tiempo, siendo que ninguno de los demás tratamientos registró un porcentaje de remoción mayor al 70% en ninguna parte del experimento.

## 7.4 Nitratos

El análisis ANOVA de las concentraciones finales de NO<sub>3</sub> (Tabla 81) mostró que al menos un cultivo tuvo diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales de NO<sub>3</sub>, por lo que se procedió a comparar los tratamientos mediante la prueba SNK (Tabla 82).

Tabla 81. Estadísticos de ANOVA para el día 15 NO<sub>3</sub>.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	21547.3	2693.4	1120.9	< 2.2e-16	La concentración final de NO <sub>3</sub> de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	43.3	2.4			

$\alpha=0.05$

El SNK resaltó en primer lugar, que las concentraciones finales de NO<sub>3</sub> registradas para el cultivo control no fueron estadísticamente significativamente ( $\alpha=0.05$ ) de la concentración inicial, por lo que la remoción de este compuesto encontrada durante los experimentos puede atribuirse íntegramente al cultivo de las microalgas.

Tabla 82. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para NO<sub>3</sub> Día 15.

Tratamientos	D+N+T	D+T	T	D	D+N	T+N	N	C	I
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% de remoción</b>	100%	100%	100%	98.4%	88.7%	73.4%	70.6%	2.7%	
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 ***	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 ***	6-2 ***	7-3 ***	8-4 ***	9-5 ***				
<b>4</b>	4-1 ns	5-2 ***	6-3 ***	7-4 ***	8-5 ***	9-6 ***			
<b>3</b>	3-1 ns	4-2 ns	5-3 ***	6-4 ***	7-5 ***	8-6 ***	9-7 ***		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 ns	4-3 ns	5-4 ***	6-5 ***	7-6 ***	8-7 ***	9-8 ns	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

Por otro lado, el SNK, mostró que los cultivos con mejor porcentaje de remoción D+N+T, D+T, T y D (100%, 100%, 100% y 98.4%) no son estadísticamente distintos ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales, por cual, puede considerarse que estos tuvieron la misma eficacia. Es interesante resaltar que la microalga *Tetraselmis chui* estuvo presente en tres de los cultivos antes mencionados y que está por si misma tiene un porcentaje de remoción del 100%.

El tratamiento con el menor porcentaje de remoción fue el cultivo N, el cual el SNK mostró que fue estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) de los demás. Esto puede observarse gráficamente en la Figura 38.

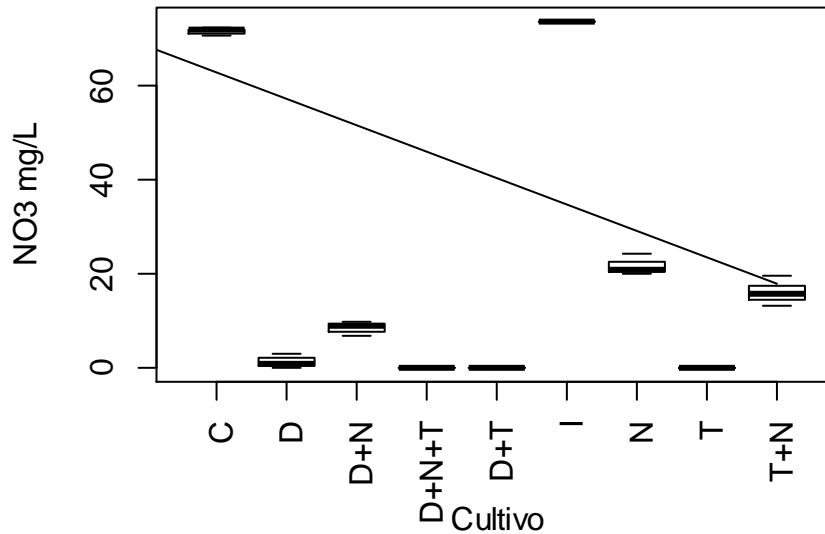


Figura 38. Concentraciones finales de NO<sub>3</sub> por cultivo.

Para verificar si las concentraciones de NO<sub>3</sub> durante los experimentos variaban en función del cultivo, se realizó el análisis de ANCOVA (Tabla 83). Este mostró que al menos uno de los tratamientos modificaba en forma diferente a los demás la concentración de NO<sub>3</sub> a lo largo del experimento.

Tabla 83. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de NO<sub>3</sub> en función de los días y cultivo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
Días	1	186.7	186.7	299.2	< 2.2e-16 ***	La concentración de NO <sub>3</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo
Cultivo	8	225.8	28.2	45.2	< 2.2e-16 ***	La concentración de NO <sub>3</sub> es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
Interacción Días: Cultivo	8	120.6	15	24.1	< 2.2e-16 ***	La concentración de NO <sub>3</sub> a lo largo de los días, es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
Residuales	171	106.7	0.624			

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*' >0.05 'ns'

Lo anterior puede observarse gráficamente en la Figura 39, donde en primer lugar, se aprecia que no existen diferencias entre el modelo lineal del control y la concentración inicial. También se observa que las líneas con mayor pendiente corresponden a los tratamientos con mejor porcentaje de remoción D+N+T, D+T y T. Las diferencias de estos tres modelos pueden deberse a que, aunque las concentraciones finales de estos no fueron estadísticamente distintas, las concentraciones de  $\text{NO}_3$  a lo largo del experimento pudieron variar en función de cada cultivo (Tabla Anexo 4).

Es necesario mencionar que el ajuste de varios de los modelos lineares no fue bueno.

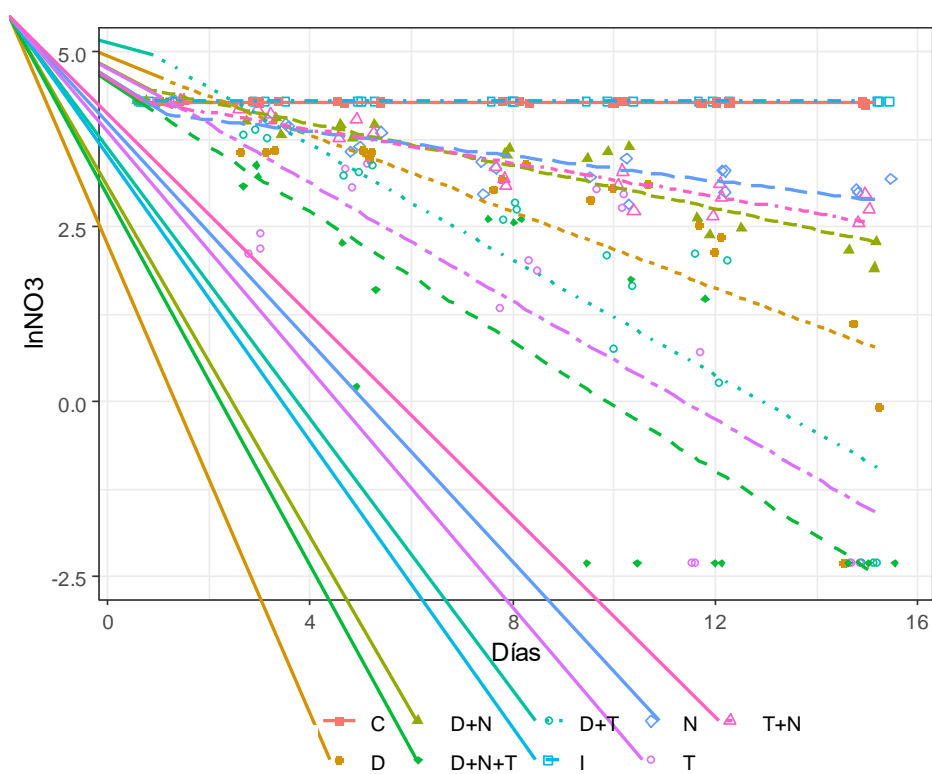


Figura 39. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de  $\text{NO}_3$ .

La Figura 40 muestra el comportamiento de las concentraciones de  $\text{NO}_3$  en función de cada cultivo. En esta gráfica, se puede advertir que el cultivo D+N+T, fue el tratamiento que logra el mejor porcentaje de remoción en el menor tiempo posible, puesto que, durante los primeros cinco días del experimento, este cultivo removió



el 92.9% del nitrato en su medio, siendo que el resto de los cultivos logran esto al menos hasta el décimo día.

Considerando todo lo anterior con respecto a  $\text{NO}_3$ , se puede decir que los mejores tratamientos al final del experimento fueron los cultivos D+N+T, D+T, T y D los cuales logran un porcentaje de remoción cercano 100% y no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales.

Sin embargo, son los cultivos D+N+T y T los que alcanzan el mejor porcentaje de remoción en menor tiempo, por lo que puede considerarse a estos los que tienen el mejor desempeño de todos en términos de porcentaje y velocidad de remoción.

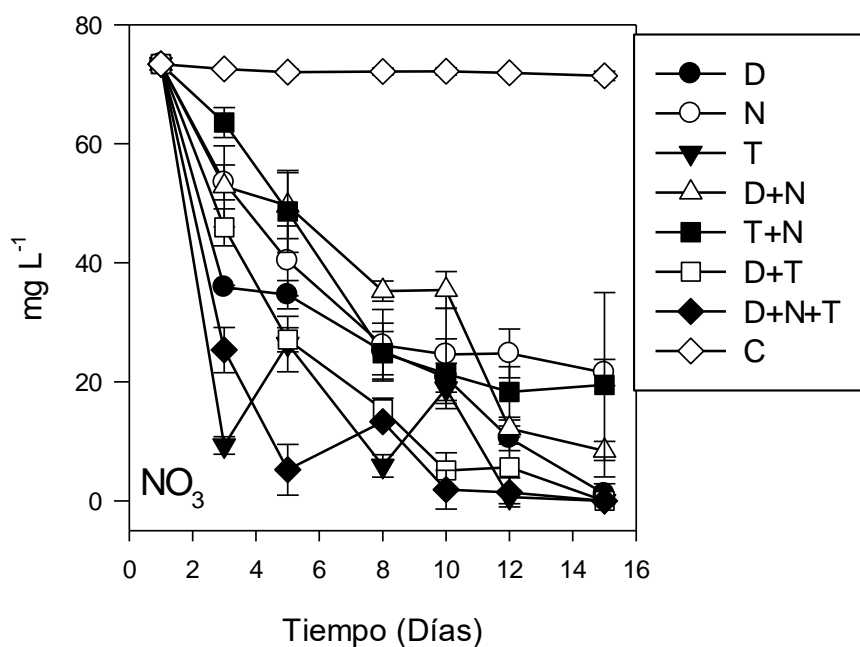


Figura 40.  $\text{NO}_3$  en función del tiempo.

## 7.5 DQO

Para la Demanda Química de Oxígeno el ANOVA (Tabla 84), reveló que existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) de las concentraciones finales de este parámetro en al menos uno de los tratamientos. Dado esto, se procedió a realizar el SNK para buscar cuales eran los diferentes.

Tabla 84. Estadísticos de ANOVA para el día 15 DQO.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	274912	34364	279.52	< 2.2e-16	La DQO final promedio de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	2213	123			

$\alpha = 0.05$

El SNK de la DQO (Tabla 85), mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la concentración final registrada para este parámetro y la concentración inicial, por lo que se las disminuciones de este parámetro medidas en el experimento, pueden atribuirse totalmente al efecto del cultivo de las microalgas.

Tabla 85. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para DQO Día 15.

Tratamientos	D+N+T	D+T	N	T+N	D+N	T	D	C	I
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>% de remoción</b>	100%	100%	95.9%	89.0%	84.6%	83.7%	82.9%	5.1%	
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 **	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 **	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 **	6-2 **	7-3 **	8-4 ***	9-5 ***				
<b>4</b>	4-1 ns	5-2 **	6-3 **	7-4 ns	8-5 ***	9-6 ***			
<b>3</b>	3-1 ns	4-2 *	5-3 **	6-4 ns	7-5 ns	8-6 ***	9-7 ***		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 ns	4-3 ns	5-4 ns	6-5 ns	7-6 ns	8-7 ***	9-8 ns	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

El SNK, también mostró que los cultivos D+N+T, D+T y N, no fueron estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ), estos tuvieron un porcentaje remoción de 100%, 100% y 95.9% respectivamente y puede considerarseles como los mejores tratamientos. Por otro lado, se encontró que las concentraciones finales de DQO del cultivo T+N, no fueron estadísticamente distintas de las del cultivo D+N+T. Sin embargo, hay que tomar esta comparación con cautela, dado el cultivo T+N, tuvo una desviación estándar de  $12 \text{ mg L}^{-1}$  en sus concentraciones finales (Figura 41).

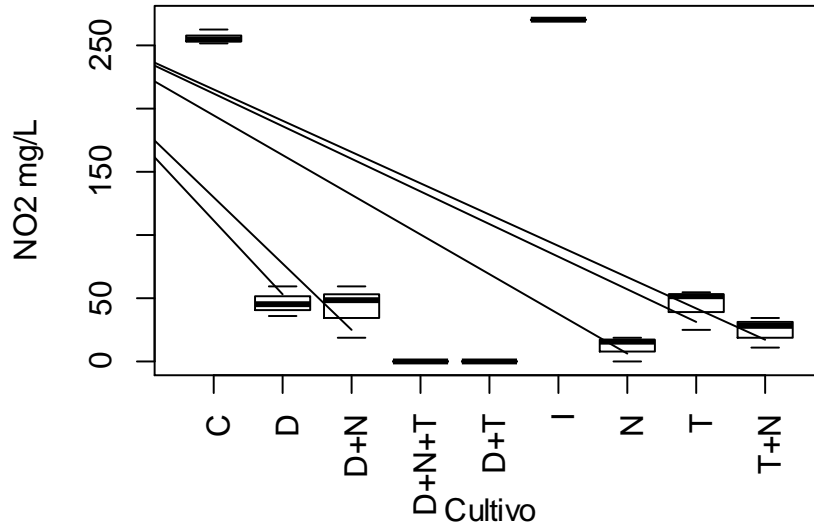


Figura 41. Concentraciones finales de DQO por cultivo.

El ANCOVA de la DQO en este experimento, ofrece indicios de que la DQO cambia de manera diferente a lo largo de los días en función de al menos un cultivo (Tabla 86).

Tabla 86. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de DQO en función de los días y cultivo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
Días	1	216.4	216.4	80.6	4.771e-16 ***	La DQO es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo
Cultivo	8	438.2	54.7	20.4	< 2.2e-16 ***	La DQO es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
Interacción Días: Cultivo	8	160.4	20.0	7.4	1.587e-08 ***	La DQO a lo largo de los días, es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
Residuales	171	458.9	2.6			

Significancia: <0.001 \*\*\*\* <0.01 \*\*\* <0.05 \*\* >0.05 'ns'

Lo anterior puede apreciarse gráficamente en la Figura 42, donde se observa que dos de los cultivos con mejor porcentaje de remoción D+N+T y D+T, tienen pendientes negativas pronunciadas, los resultados de la comparación de las

pendientes de estos modelos lineales se exponen en la Tabla Anexo 5. En la Figura 43 se puede observar el comportamiento de la DQO a lo largo del experimento.

De igual manera que con todos los parametros fisicoquímicos abordados anteriormente, es necesario mencionar que el  $R^2$  de algunos de los modelos lineales no fue bueno.

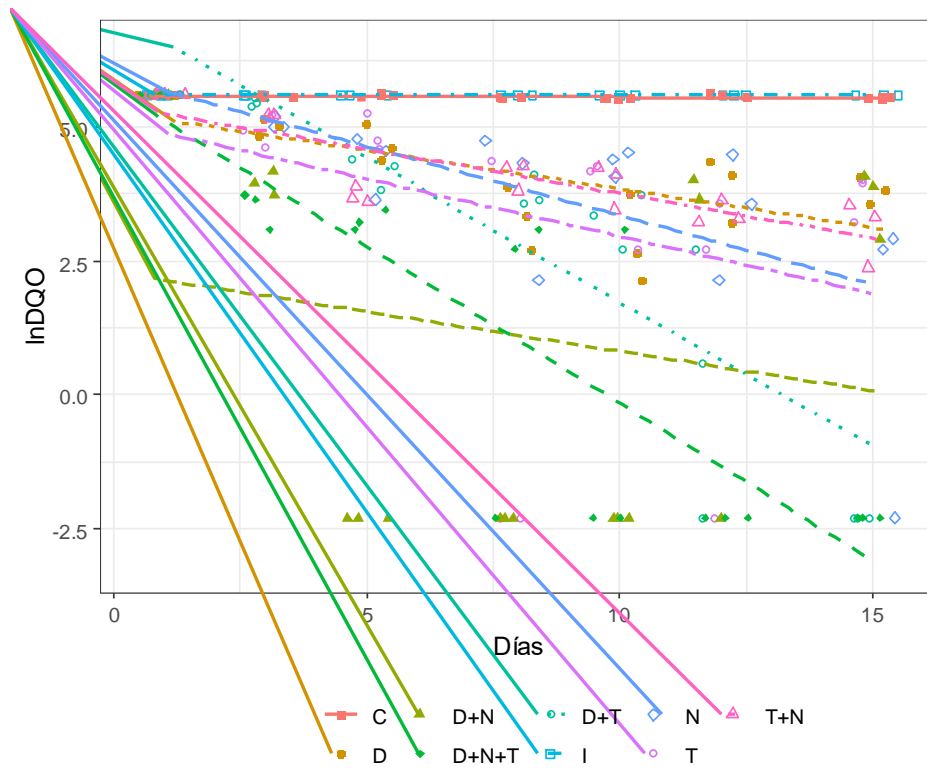


Figura 42. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de DQO.

Se aprecia que el cultivo D+N registró concentraciones muy bajas de DQO al día cinco del experimento, estas concentraciones corresponden a una remoción 100%, por lo que puede aseverarse que este cultivo es el que logró el porcentaje de remoción más alto en el menor tiempo posible. Es necesario mencionar que el cultivo D+N tuvo el quinto mejor porcentaje de remoción final, dado que sus registros de DQO comenzaron a aumentar a partir del doceavo día de experimento.

Como resumen del análisis de la DQO, se puede decir que los cultivos con mejor porcentaje de remoción final fueron D+N+T, D+T y N con remociones casi del 100%, sin embargo, el co-cultivo con D+N mostró un porcentaje de remoción similar a los cinco días de cultivo.

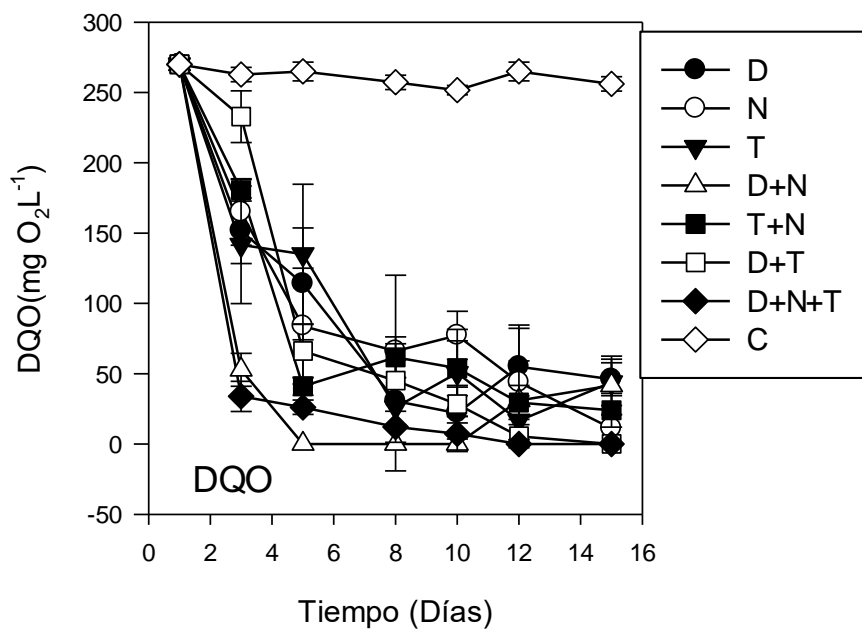


Figura 43. DQO en función del tiempo.

### 7.6 Biomasa seca

El análisis del peso seco en ANOVA de los pesos secos finales de cada cultivo (Tabla 87) mostró que existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en las concentraciones de al menos un cultivo, por lo que se realizó también un análisis SNK (Tabla 88).

El SNK reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre en cultivo control y las concentraciones iniciales de biomasa seca. En el caso específico de este parámetro, se consideró que  $0 \text{ mg L}^{-1}$ , era la concentración de biomasa seca antes del inoculo y cultivo de las diferentes microalgas. Dado lo anterior se puede atribuir a las microalgas la totalidad del aumento de biomasa registrado durante los experimentos.

Tabla 87. Estadísticos de ANOVA para el día 15 Peso seco.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	4.3	0.5	216.4	2.76E-16	La concentración final de peso seco de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	0.04	0.002			

$\alpha = 0.05$

Por otro lado, en SNK del peso seco reveló que el cultivo N, el cual tuvo la mayor productividad de biomasa y tasa de crecimiento específico ( $52.08 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  y  $0.08 \text{ Día}^{-1}$ ), fue estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) a los demás, por lo que se puede considerar a este tratamiento como el que tuvo el mejor rendimiento de todos (Figura 44).

Asimismo con el SNK, se observó que los cultivos D+T, T+N, D+N y D no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ), teniendo estos tratamientos un peso seco final cercano a  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Tabla 88). Lo que concuerda con las productividades registradas para estos cultivos, las cuales estuvieron entre de  $23\text{-}27 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ , con excepción de la del cultivo D que fue de  $19.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ . Dado lo anterior se puede considerar que los cultivos D+T, T+N, D+N y D tuvieron el mismo rendimiento en cuanto a producción de biomasa seca se refiere (Figura 44).

Tabla 88. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para Peso Seco Día 15.

Tratamientos	I	C	T	D+N+T	D+T	T+N	D+N	D	N
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Peso seco final (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>	0	0.06	0.667	0.773	0.973	0.977	1.003	1.022	1.151
<b>Productividad (<math>\text{mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}</math>)</b>			1.2	16.6	25.5	23.08	27.5	19.4	52.08
<b><math>\mu</math></b>			0.05	0.03	0.03	0.05	0.03	0.03	0.08
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 ***	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 ***	6-2 ***	7-3 ***	8-4 ***	9-5 **				
<b>4</b>	4-1 ***	5-2 ***	6-3 ***	7-4 ***	8-5 ns	9-6 **			
<b>3</b>	3-1 ***	4-2 ***	5-3 ***	6-4 ***	7-5 ns	8-6 ns	9-7 **		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 ***	4-3 *	5-4 ***	6-5 ns	7-6 ns	8-7 ns	9-8 **	

Significancia: <0.001 \*\*\*\* <0.01 \*\*\* <0.05 \*\* >0.05 'ns';  $\mu$ : Tasa de crecimiento específico.

El cultivo con el rendimiento más bajo fue el cultivo T, el cual tuvo la productividad y el peso seco final más bajos. De igual forma el SNK mostró que este tratamiento fue estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) de los demás (Figura 44, Tabla 88).

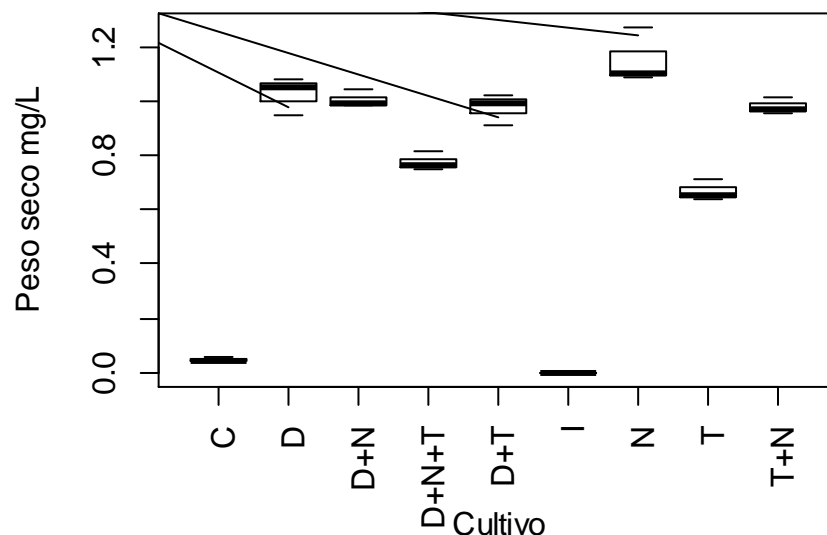


Figura 44. Concentraciones finales de Peso Seco por cultivo.

Tabla 89. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de Peso Seco.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
Días	1	1.6	1.6	522.6	< 2.2e-16 ***	La concentración de peso seco significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo
Cultivo	8	19.4	2.4	784.6	< 2.2e-16 ***	La concentración de peso seco es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
Interacción Días: Cultivo	8	0.8	0.1	34.4	< 2.2e-16 ***	La concentración de peso seco a lo largo de los días es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
Residuales	147	0.4	0.003			

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

En análisis de ANCOVA de los datos de peso seco, mostró que existieron diferencias estadísticas ( $\alpha=0.05$ ) en el comportamiento de las concentraciones de

peso seco en función de cultivo a lo largo de los días del experimento, los datos de las comparaciones de los modelos lineares se pueden encontrar en la Tabla Anexo 6 y se pueden observar gráficamente en la Figura 45.

Hay que resaltar que este análisis carece de una robustez adecuada, dado que la mayor parte de los modelos lineales obtenidos para cada tratamiento tuvieron una  $R^2$  menor a 0.4 por lo cual el ajuste de estos no fue bueno.

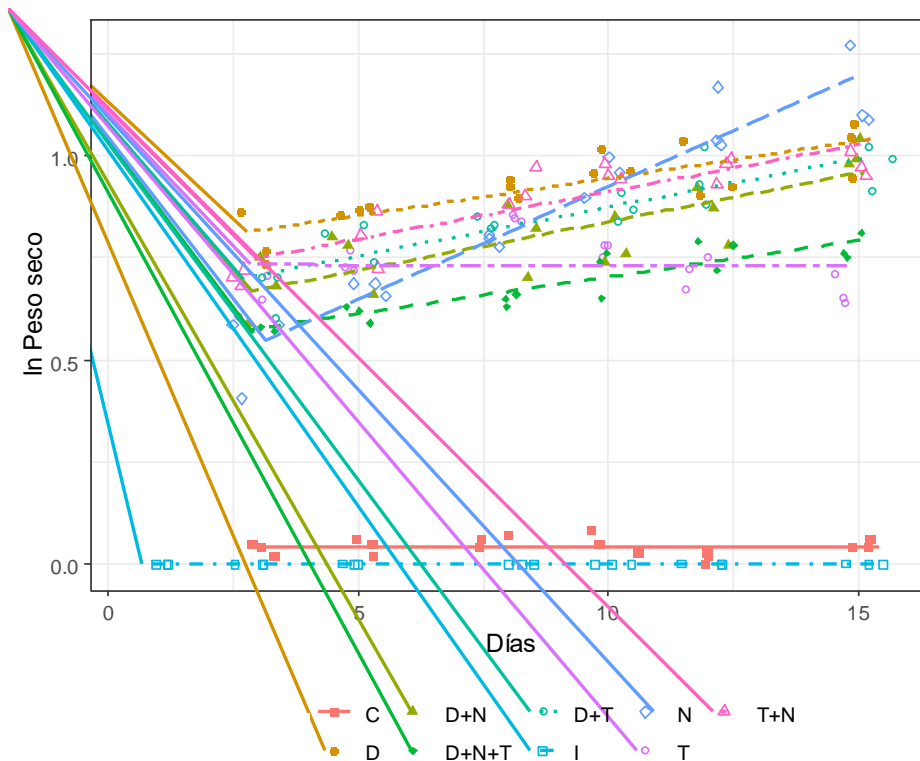


Figura 45. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de Peso Seco.

Con la Figura 46 se observa el crecimiento del peso seco de los cultivos a lo largo del experimento. Se aprecia como algunos de los tratamientos como D+N+T y T no sobrepasan el  $1 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca en ninguna parte del experimento.

Se debe resaltar que el cultivo T mostró un crecimiento negativo a partir del octavo día de cultivo, lo que probablemente se debió a que las células de *Tetraselmis* en el medio comenzaron a morir a partir de ese punto. Asimismo, el crecimiento negativo fue la causa de que este tratamiento tuviera la menor tasa de crecimiento específico, la menor concentración final de biomasa y la menor productividad de todos.



Es interesante destacar lo anterior ya que, el fenómeno de crecimiento negativo no se observó en ninguno de los co-cultivos donde la microalga *Tetraselmis* estuvo presente, lo que da evidencia para pensar que, aunque la presencia de *Tetraselmis* en los co-cultivos decayera durante los experimentos, alguna de las otras especies de microalgas presentes en el medio pudo haber mantenido el crecimiento de la biomasa evitando que este se volviera negativo, lo cual según la literatura es una de las ventajas que tienen los co-cultivos sobre los cultivos monoespecíficos.

No obstante, lo anterior no aseguró que la productividad de biomasa fuera buena, ya que *Tetraselmis* también estuvo presente en el co-cultivo D+N+T el cual tuvo la segunda menor productividad y concentración final de biomasa seca (Tabla 88).

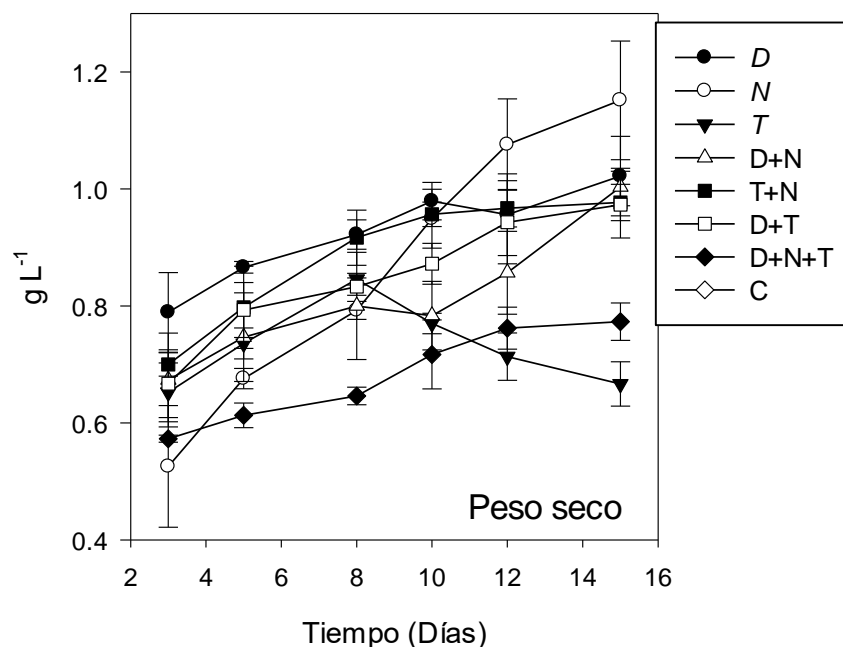


Figura 46. Peso seco en función del tiempo.

Como resumen del peso seco se puede decir que el cultivo monoespecífico de *Nannochloropsis oculata* o N, fue el tratamiento con el mejor rendimiento ya que tuvo la mayor tasa de crecimiento específica, la mayor concentración final de biomasa seca y la mayor productividad. Si se observa la Tabla 90, se puede apreciar

Tabla 90. Productividades de biomasa y lípidos registradas en otros estudios.

	Productividad de biomasa (mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Productividad de Lípidos (mg L <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Dunaliella primolecta</i>	90	20.7	Sheehan <i>et al.</i> 1998
<i>Dunaliella salina</i>	93.3	93.3	Weldy y Huesemann, 2007
<i>Dunaliella</i> sp.	68.9	16.43	Sacristan de Alva <i>et al.</i> 2018
<i>Dunaliella</i> sp.	100	12.2	Clairin-Savage, 2019
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	341	38	Breuer <i>et al.</i> 2012
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	45	10.5	Gouveia y Oliveira, 2009
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	367.2	62.4	Francisco <i>et al.</i> 2010
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	487	56	Breuer <i>et al.</i> 2012
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	7.5	2.5	Donghui <i>et al.</i> 2016
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	120	20	Gouveia <i>et al.</i> 2009
<i>Nannochloropsis oculata</i>	80	38.4	Su <i>et al.</i> 2010
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20.4	1.7	See <i>et al.</i> 2011
<i>Nannochloropsis oculata</i>	152.3-287.6	64.7	Gu <i>et al.</i> 2012
<i>Nannochloropsis oculata</i>	88	7.34	Sacristan de Alva <i>et al.</i> 2018
<i>Nannochloropsis oculata</i>	370-480	84.0-142.0	Sheehan <i>et al.</i> 1998
<i>Nannochloropsis oculata</i>	130	13	Su <i>et al.</i> 2009
<i>Nannochloropsis oculata</i>	77.27	22.15	Clairin-Savage, 2019
<i>Nannochloropsis</i> sp.	35.3	9.8	Jiang <i>et al.</i> 2011
<i>Nannochloropsis</i> sp.	46.5	19.5	Moazami <i>et al.</i> 2011
<i>Nannochloropsis</i> sp.	20	6.3	Huerlimann <i>et al.</i> 2010
<i>Tetraselmis chui</i>	127.08 ± 11.75		Lari <i>et al.</i> 2019
<i>Tetraselmis chui</i>	116.49 ± 7.03		Lari <i>et al.</i> 2019
<i>Tetraselmis chui</i>	132.8	21.9	Sacristan de Alva <i>et al.</i> 2018
<i>Tetraselmis chui</i>	89.28	37.78	Clairin-Savage, 2019
<i>Tetraselmis</i> sp.	22.7	2.4	Huerlimann <i>et al.</i> 2011
<i>Tetraselmis</i> sp.	118	21.4-48.9	Kim <i>et al.</i> 2011
<i>Tetraselmis</i> sp.	243	85.5	Fon-Sing y Borowitzka, 2016
<i>Tetraselmis</i> sp.	126	47.3	Kim <i>et al.</i> 2016
<i>Tetraselmis chui</i>	1.25	2.49	Este estudio
<i>Dunaliella</i> sp.	19.42	2.7	Este estudio
<i>Nannochloropsis oculata</i>	52.08	4.8	Este estudio

que la productividad de  $52.08 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  registrada para N durante este estudio es muy baja si se le compara con la registrada en trabajos como el de Gu *et al.* (2012), Sheehan *et al.* (1998) o Su *et al.* (2009) que encontraron productividades de 152.3-287.6, 370-480 y  $130 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  respectivamente. Esto puede deberse a que en tales trabajos se utilizaron medios de cultivo que cumplían con los requerimientos óptimos de nutrientes para el crecimiento de las microalgas, en contraste con este trabajo donde el medio de cultivo fue ARS.

No obstante, si comparamos con otros trabajos como el de See *et al.* (2011), Jiang *et al.* (2011) o Moazami *et al.* (2011) donde se encontraron productividades de 20.4, 35.3 y  $46.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , la productividad medida en este estudio es mayor, lo que puede deberse a las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en cada estudio.

Por ejemplo, los estudios de See *et al.* (2011) y See *et al.* (2011) utilizaron intensidades de luz de  $36.3$  y  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  respectivamente, las cuales son más bajas que la intensidad de luz de  $150\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  utilizada durante este experimento.

Moazami *et al.* (2011) utiliza condiciones de cultivo similares a las de este trabajo, por lo que su baja productividad puede deberse a que la cepa utilizada durante sus experimentos es tipo silvestre (del inglés *wild type*), se sabe por algunos estudios como el de Schenk *et al.* (2008) que este tipo de cepas tienen una baja eficiencia fotosintética dado que disipan como fluorescencia y calor hasta el 90% de la energía lumínica que captan, lo que tiene como consecuencia que los cultivos tengan una baja productividad (sobre todo a baja escala).

## 7.7 Lípidos

El ANOVA de la concentración final de lípidos en biomasa mostró que al menos uno de los cultivos tuvo concentraciones finales estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ; Tabla 91).

Tabla 91. Estadísticos de ANOVA para el día 15 Lípidos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	35964	4495.5	24.5	3.659e-08	La concentración final de lípidos de al menos un cultivo es significativamente diferente.
<b>Residuales</b>	18	3303	183.5			

$\alpha = 0.05$

Se aplicó una prueba de SNK para buscar cuales eran los tratamientos con diferencias estadísticas (Tabla 92). En primer lugar, se encontró que las concentraciones de lípidos registradas en el experimento control no eran estadísticamente distintas de la concentración inicial, esto considerando a 0 g L<sup>-1</sup> como concentración inicial de lípidos antes de la siembra y cultivo de las microalgas. Dado lo anterior, todos los cambios en la concentración de lípidos en biomasa registrados durante el experimento se debieron al cultivo de las microalgas.

Tabla 92. Prueba estadística Student-Newman-Keuls para Lípidos Día 15.

Tratamientos	C	I	T	T+N	D+N+T	D+T	N	D	D+N
<b>Comparaciones:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Concentración final (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0	0	35.9	45.4	50.9	71.6	72.3	97.8	110.4
<b>Productividad (mg L<sup>-1</sup> Día<sup>-1</sup>)</b>			2.4	3.2	4.04	4.7	4.8	2.7	6.8
<b>% Peso seco final</b>			5.3	4.6	6.5	7.3	6.3	9.6	11.0
<b>9</b>	9-1 ***								
<b>8</b>	8-1 ***	9-2 ***							
<b>7</b>	7-1 ***	8-2 ***	9-3 ***						
<b>6</b>	6-1 ***	7-2 ***	8-3 ***	9-4 ***					
<b>5</b>	5-1 **	6-2 ***	7-3 *	8-4 **	9-5 ***				
<b>4</b>	4-1 **	5-2 **	6-3 *	7-4 ns	8-5 **	9-6 *			
<b>3</b>	3-1 *	4-2 **	5-3 ns	6-4 ns	7-5 ns	8-6 ns	9-7 **		
<b>2</b>	2-1 ns	3-2 **	4-3 ns	5-4 ns	6-5 ns	7-6 ns	8-7 *	9-8 ns	

Significancia: <0.001 '\*\*\*\*' <0.01 '\*\*\*' <0.05 '\*\*' >0.05 'ns'

El SNK arrojó que los cultivos D y D+N los cuales tuvieron las concentraciones finales de lípidos más altas con 97.8 y 110.4 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, no fueron estadísticamente diferentes. Esto puede explicarse tomando en cuenta la desviación estándar de tales cultivos, ya que el último día de monitoreo sus

desviaciones fueron de  $26.144 \text{ mg L}^{-1}$  y  $21.169 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, lo cual hace que la dispersión de los datos de ambos tratamientos se traslape y no difieran estadísticamente (Figura 47). Se puede destacar que los tres cultivos con las concentraciones finales más altas de lípidos N, D y D+N también tuvieron las concentraciones finales más altas de peso seco.

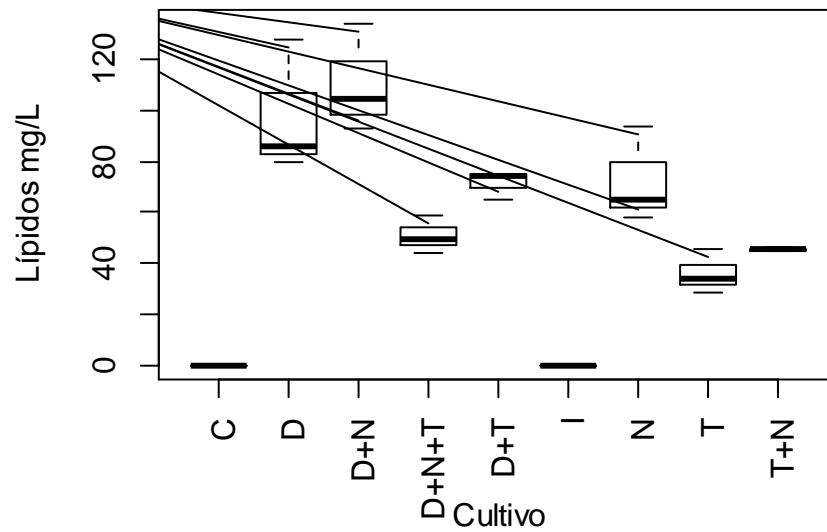


Figura 47. Concentraciones finales de Lípidos en biomasa por cultivo.

Los tratamientos D+N y D también fueron similares en su porcentaje de lípidos en peso seco, ya que tuvieron 11.0% y 9.6% respectivamente (Tabla 92). Sin embargo, difieren bastante en términos de productividad ya que el cultivo D+N tuvo una productividad de  $6.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  mientras que D registró  $2.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ .

Lo anterior, puede explicarse si se tiene en cuenta que la concentración inicial de lípidos en D fue más grande que la de D+N, lo cual puede ser consecuencia del uso de la densidad óptica como parámetro para monitorear que el crecimiento de los inóculos, puesto que la densidad óptica en las microalgas se basa mayoritariamente en la cantidad de clorofila presente dentro de las células y no directamente en la concentración de biomasa (Kruskopf y Flynn, 2006). El cultivo con la menor concentración final de lípidos fue T con  $35.968 \text{ mg L}^{-1}$ , este fue estadísticamente similar con los cultivos T+N y D+N+T. El cultivo T también mostró la peor productividad, así como el segundo peor porcentaje de lípidos en peso seco.

El análisis de ANCOVA de las concentraciones de lípidos mostró, que existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en el comportamiento de estos compuestos a lo largo del tiempo en función del cultivo (Tabla 93).

Los resultados de la comparación de los modelos lineales obtenidos para este análisis se muestran en la Tabla Anexo 7 y gráficamente en la Figura 48.

Tabla 93. Estadísticos de ANCOVA para la concentración de Lípidos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Interpretación
Días	1	54846	54846	435.0	< 2.2e-16 ***	La concentración de lípidos es significativamente diferente en al menos uno de los días de monitoreo
Cultivo	8	75655	9457	75.0	< 2.2e-16 ***	La concentración de lípidos es significativamente diferente en al menos uno de los tipos de cultivo.
Interacción Días: Cultivo	8	25688.0	3211.0	25.4	< 2.2e-16 ***	La concentración de lípidos a lo largo de los días es significativamente diferente en al menos uno de los cultivos.
Residuales	171	21559.0	126.0			

**Significancia:** <0.001 \*\*\*\* <0.01 \*\*\* <0.05 \*\* >0.05 'ns'

La Figura 49 muestra el comportamiento de los lípidos a lo largo del experimento, se puede notar que las concentraciones iniciales estuvieron entre 0-20 mg L<sup>-1</sup> para casi todos los cultivos, se observa que la concentración en cada día cambió en función de cada cultivo (como lo evidenció el ANCOVA). Se puede apreciar igualmente que los cultivos D y D+N fueron los que tuvieron la concentración final más alta. Se puede observar también, que el resto de los cultivos no superaron en promedio 70 mg L<sup>-1</sup>.

Para resumir, en cuanto a lípidos los cultivos D y D+N fueron los que tuvieron la mayor concentración final de estos compuestos y no fueron estadísticamente diferentes en ese punto. No obstante, el co-cultivo D+N también tuvo la mejor

productividad de todo el experimento, por lo cual puede considerarse a este ultimo como el cultivo con mejor rendimiento. Se resalta que la alga *Dunaliella* estuvo presente en los dos cultivos con mejor concentracion final.

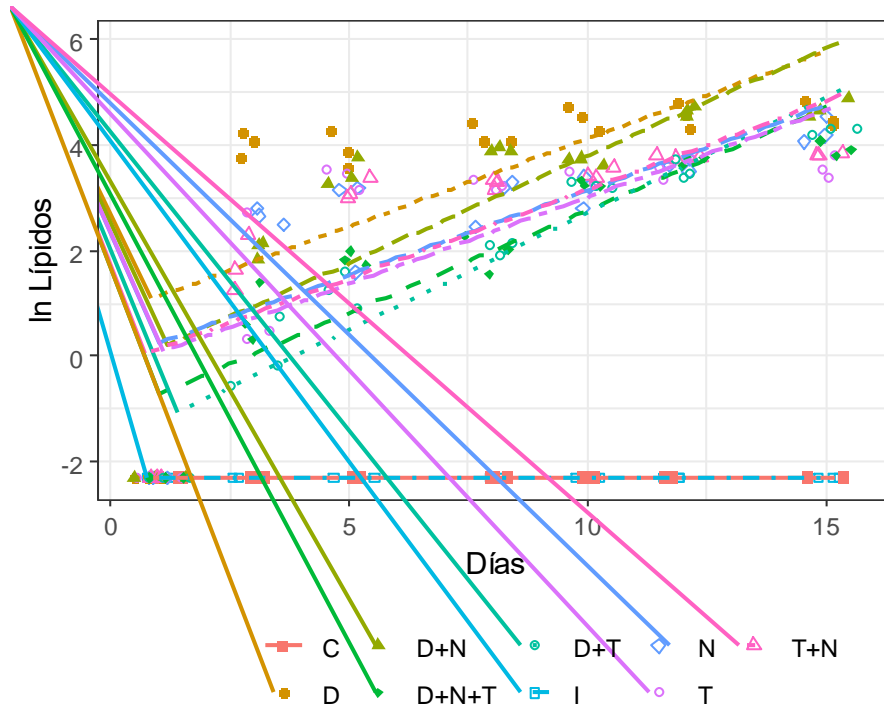


Figura 48. Modelos lineales obtenidos a partir de la concentración de Lípidos

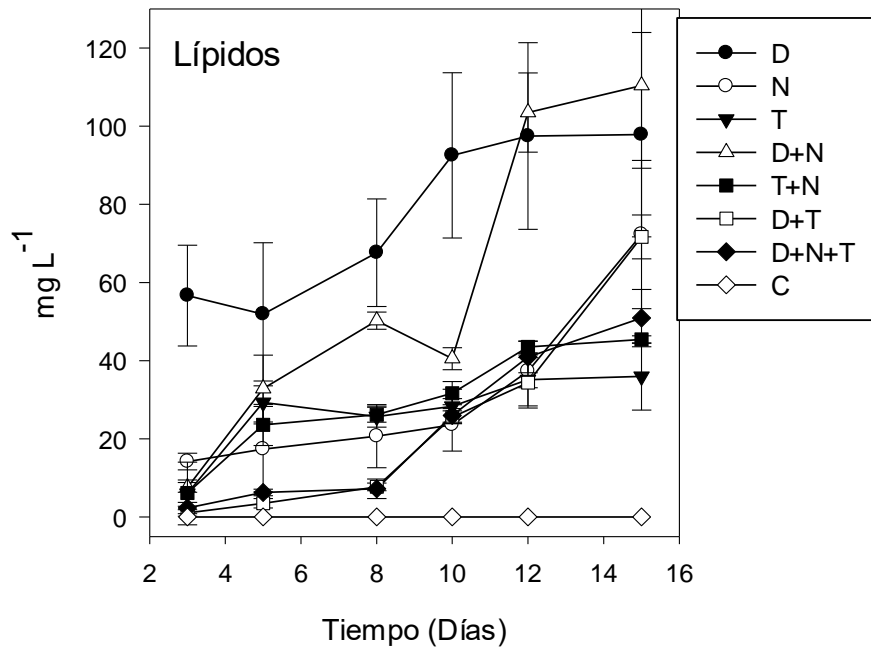


Figura 49. Lípidos en función de tiempo.

Por otro lado, si se compara la productividad de D+N ( $6.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ ) con las productividades medidas en otros experimentos (Tabla 90), se puede observar que esta es inferior a la mayoría de los registros ahí mostrados, lo cual se explica por el uso de ARS como medio de cultivo, siendo que este no aporta los nutrientes adecuados para el crecimiento de las microalgas.

De igual forma, la baja productividad puede deberse a que el método de cultivo no estaba enfocado a la producción de lípidos, esto se observa igualmente en trabajos como el de Gu *et al.* (2012), donde mediante el aumento de salinidad durante el experimento y medios de cultivo libres de nutrientes, logran una productividad promedio de  $64.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ , la cual es casi 10 veces más alta que la registrada en este experimento.

El trabajo de Sacristán de Alva *et al.* 2018, reporta productividades de 16.4 y  $7.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  para *Dunaliella* y *Nannochloropsis* cultivadas en un ARS con la misma composición a la utilizada durante este estudio. Dado que estas productividades también pueden considerarse bajas si se comparan con las mostradas en la Tabla 90, se tiene evidencia para considerar que el medio de cultivo no brindó los requerimientos adecuados para que las microalgas tuvieran una buena productividad de lípidos.

## 7.8 Lípidos vs. Nitrógeno

Para analizar la relación entre la concentración de lípidos y la concentración de nitrógeno, los datos de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_2$  de cada tratamiento fueron sumados para obtener un valor de nitrógeno total (NT). La cinética de remoción, concentraciones durante el cultivo y concentraciones finales de este nuevo parámetro se muestran en la Tabla 94 y Figura 52c.

Tabla 94. Datos de Nitrógeno Total

Tratamientos	I	C	T	D+N	D+T	D+N+T	N	D	T+N
<b>Concentración final</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )		106.4	28.3	20.3	15.7	12.0	11.5	5.5	3.5
<b>% Remoción</b>		5.9	74.9	82.0	86.1	89.3	89.8	95.1	96.9
<b>Cinética de remoción</b> ( $\text{mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$ )		0.4	5.6	6.2	6.5	6.7	6.8	7.2	7.3



Se realizó una prueba de ANOVA para comprobar si la concentración de nitrógeno total era un factor significativo para la productividad de lípidos, esto también con el objetivo de verificar si existió estrés por nitrógeno durante el experimento. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 95.

El ANOVA mostró que la variación producida por la concentración de nitrógeno total es estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ), por lo que la concentración de lípidos durante el experimento varió en función del nitrógeno presente en el medio. Esto se observa gráficamente en la Figura 50.

En las Figuras 51-52 se nota que existió una correlación negativa entre la concentración de nitrógeno total y la concentración de lípidos en biomasa, ya que conforme aumentaba el porcentaje de remoción de nitrógeno también crecía la concentración de ácidos grasos.

Tabla 95. Estadísticos de ANOVA para la concentración de Lípidos en función del Nitrógeno Total.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	P Value	Interpretación
<b>Cultivo</b>	8	93401	11675.2	105.1	< 2.2e-16 ***	La concentración de Lípidos se modifica significativamente en función de la concentración de nitrógeno total.
<b>Días</b>	1	30713	30713.5	276.5	< 2.2e-16 ***	
<b>NT</b>	1	1565	1565	14.0	0.0002489 ***	
<b>Cultivo: Día</b>	8	20117	2514.6	22.6	< 2.2e-16 ***	
<b>Residuales</b>	149	16547	111.1			

$\alpha= 0.05$

De igual forma se observa que todos los experimentos que registraron concentraciones por arriba de 100 mg L<sup>-1</sup> de lípidos lo hicieron cuando la concentración de nitrógeno total era menor a 33.9 mg L<sup>-1</sup> lo que corresponde a un porcentaje de remoción de al menos 70%.

Este porcentaje de remoción es alcanzado por la mayor parte de los cultivos alrededor del día ocho, siendo los cultivos D y D+N los que logran el porcentaje de remoción de nitrógeno total más alto y la concentración final de lípidos más grande. Se puede destacar que el cultivo D+N logró el mejor porcentaje de remoción de nitrógeno total en el menor tiempo posible con un 80.8% en tres días (Figura 50). El

porcentaje de remoción elevado pudo haber acelerado la producción de lípidos induciendo estrés por nitrógeno, lo que combinado con una concentración de biomasa considerable podría explicar porque el cultivo D+N fue el que mostró la concentración final de lípidos más alta.

Esto coincide con que D+N removió el 95.4% del  $\text{NH}_4$  en tres días, hay que recordar que el amonio es la fracción de nitrógeno inorgánico que tiene preferencia de consumo en muchas especies de microalgas, por lo que el agotamiento de este compuesto podría desencadenar el efecto de estrés por nitrógeno (Qiao-Hui *et al.*, 2015; Sacristán de Alva *et al.*, 2018, Lauritano *et al.* 2019).

En caso contrario se encuentra el cultivo D+N+T el cual, logró remover aproximadamente el 60% del nitrógeno total durante los primeros cinco días del experimento, pero tuvo la tercera menor concentración final de lípidos. Esto puede explicarse si recordamos que este tratamiento también tuvo el segundo peor peso seco final (Tabla 88) y el cuarto menor porcentaje de lípidos en peso seco.

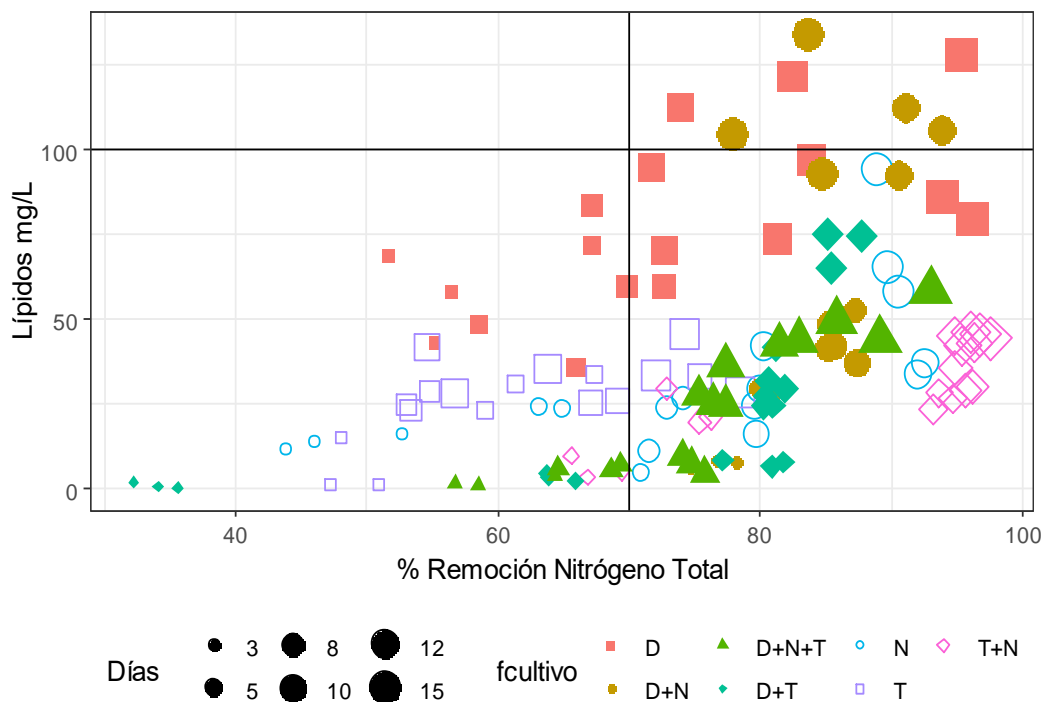


Figura 50. Concentración de Lípidos en función del Nitrógeno Total.

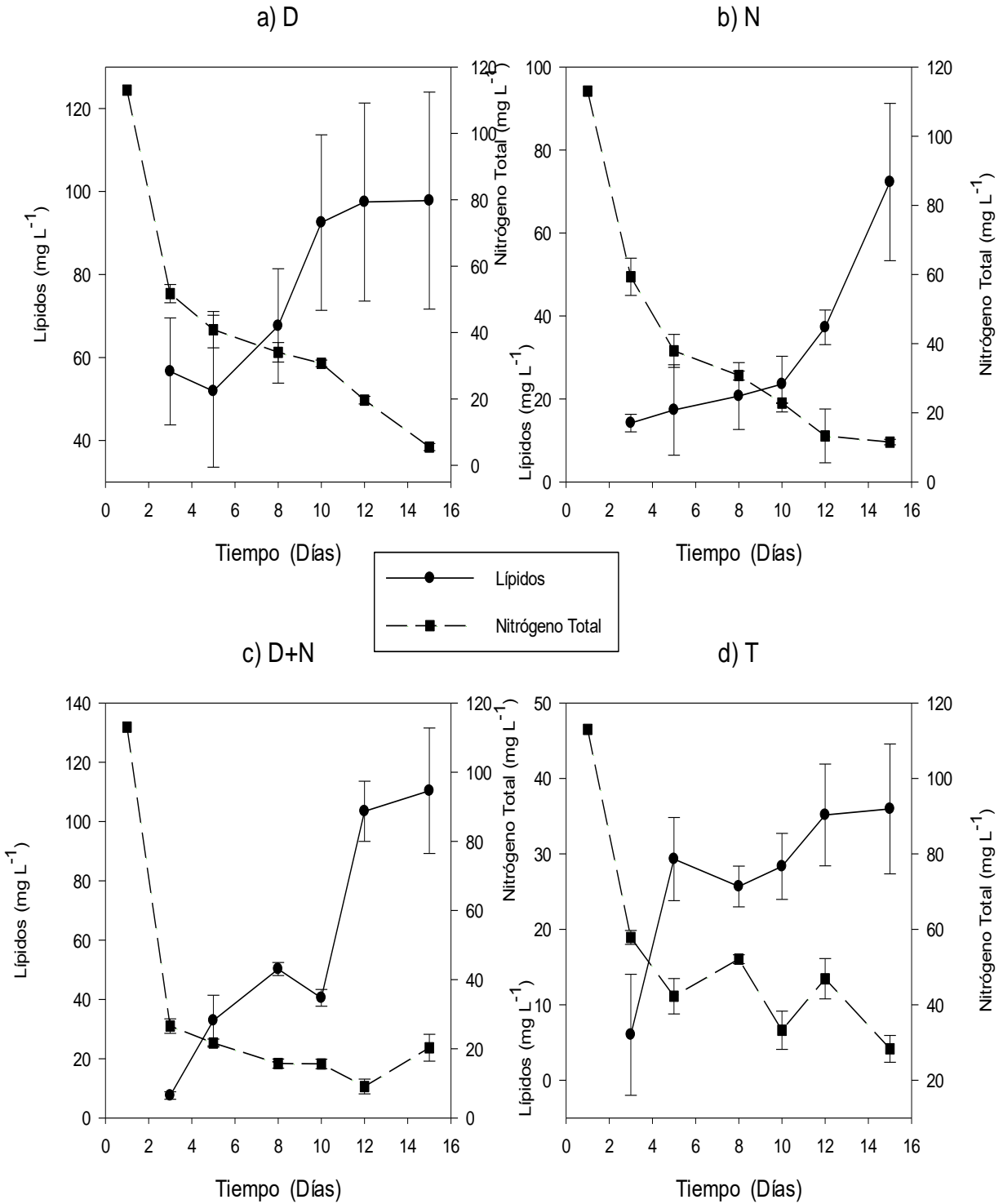


Figura 51. Comparación de concentración Nitrógeno vs Lípidos. A) *Dunaliella* sp., B) *Nannochloropsis oculata*, C) *Dunaliella* sp.- *N. oculata*, D) *Tetraselmis chui*

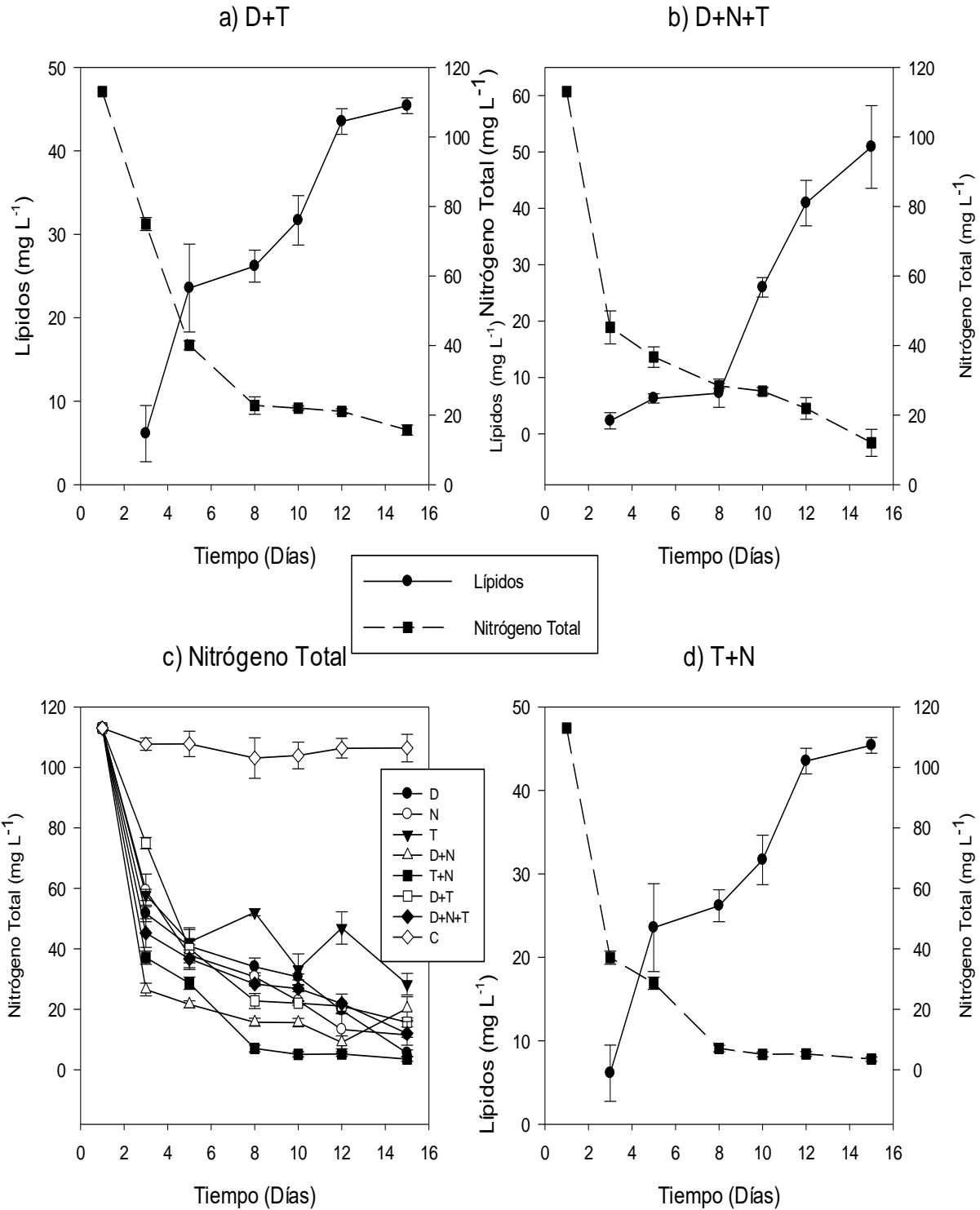


Figura 52. Comparación de concentración Nitrógeno vs Lípidos. a) *Dunaliella* sp.- *Tetraselmis chui*. b) *Dunaliella* sp.- *Nannochloropsis oculata*- *T. chui*. c) Nitrógeno total. d) *Tetraselmis chui*- *N. oculata*.

## 7.9 Co-cultivo

Para analizar si el cultivo de varias especies en conjunto tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $\alpha=0.05$ ) sobre los experimentos, se realizaron múltiples pruebas de ANOVA utilizando como variable respuesta los parámetros fisicoquímicos y celulares registrados durante el estudio, en función de los días de monitoreo en interacción con las microalgas en el cultivo (T, D, N, N+T, etc.) agregando como un factor anidado si el cultivo era mono específico o co-cultivo.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 96. Los ANOVAS resaltaron que, en todos los casos el co-cultivo tuvo un efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) sobre las concentraciones de los parámetros medidos durante el experimento, no obstante, para determinar si este efecto fue negativo o positivo es necesario analizar particularmente el caso de cada parámetro.

Tabla 96. Estadísticos de ANOVA para la influencia de los co-cultivos.

Parámetro	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Amonio (co-cultivo)	8	181127	22641	45.8	< 2.2e-16 ***
Nitritos (co-cultivo)	8	1011.1	126.3	38.5	< 2.2e-16 ***
Nitratos (co-cultivo)	8	7281	9102	52.9	< 2.2e-16 ***
Fosfatos (co-cultivo)	8	4144.7	518.0	45.5	< 2.2e-16 ***
DQO (co-cultivo)	8	1131214	141402	39.7	< 2.2e-16 ***
Peso Seco (co-cultivo)	8	19.3	2.4	324.5	< 2.2e-16 ***
Lípidos(co-cultivo)	8	84648	10581	43.7	< 2.2e-16 ***

Significancia: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Para el caso del fosfato los tratamientos con el porcentaje de remoción más alto fueron D, D+N, D+T, T, T+N; los cuales hay que recordar no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre sus concentraciones finales de  $PO_4$ . Puesto que por sí mismos, los cultivos monoespecíficos D y T lograron porcentajes de remoción elevados, se puede decir que la influencia del co-cultivo fue poco relevante.

Hablando en términos de velocidad de remoción, fue el cultivo monoespecífico D el que tuvo el mejor desempeño, ya que este removió el 100% del fosfato en tres días,

mientras que los co-cultivos alcanzaron este porcentaje de remoción al menos hasta el día 12 de experimento. Dado lo anterior, se puede aseverar que el co-cultivo no mejoró ni empeoró notablemente el porcentaje de remoción final de  $\text{PO}_4$ , asimismo, se puede decir que el co-cultivo influyó negativamente la velocidad de remoción.

Con el amonio se observó que la influencia del co-cultivo fue mixta, ya que el co-cultivo T+N fue el que tuvo el mejor porcentaje de remoción sin embargo este no fue estadísticamente distinto ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales de  $\text{NH}_4$  con los cultivos monoespecíficos D y N. Por otro lado, los co-cultivos D+T y D+N representaron el segundo y tercer peor porcentaje de remoción final, por cual puede decirse que para esos casos dos el co-cultivo tuvo un efecto negativo.

Desde el punto de vista de la cinética de remoción los co-cultivos D+N y T+N fueron los que tuvieron el primer y segundo mejor porcentaje de remoción en menor tiempo. Considerando además que T+N fue el que mostró el más alto porcentaje de remoción final, se puede decir que fue un co-cultivo el que tuvo el mejor desempeño tanto en tiempo con en cantidad de  $\text{NH}_4$  removido.

Para los nitritos se encontró que el co-cultivo T+N fue estadísticamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) de los demás tratamientos y tuvo el porcentaje de remoción más alto (100%). Ya que los tres tratamientos con mejor porcentaje de remoción fueron co-cultivos y que ninguno de los cultivos monoespecíficos mostró remociones mayores al 50%, puede considerarse en este caso que la influencia del co-cultivo fue positiva.

En cuanto al nitrato, se observó que los cultivos D+N+T, D+T y T tuvieron los mejores porcentajes de remoción final (100%, 100%, 100% respectivamente) y no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en este punto. Es interesante resaltar la presencia de *Tetraselmis* y *Dunaliella* en tales tratamientos, ya que el cultivo en solitario de estas especies por sí mismo alcanza un porcentaje de remoción final del 100% y 98%.

Lo anterior, aunado a que el co-cultivo D+N+T y el cultivo monoespecífico T fueron los que lograron los porcentajes de remoción más altos en un menor tiempo (con un 92.9% y 87.3% durante los primeros cinco días), da evidencia para aseverar que refiriéndose a nitratos, los co-cultivos generan diferencias estadísticamente

significativas ( $\alpha=0.05$ ) en términos de porcentaje y velocidad de remoción, pero estas no son tan pronunciadas, ya que el cultivo monoespecífico de las microalgas genera resultados equiparables o solo un poco inferiores.

Para la DQO, se encontró que los cultivos D+N+T, D+T y N tuvieron un porcentaje remoción de 100%, 100%, 95.9% respectivamente y no fueron significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ) en sus concentraciones finales. Se puede mencionar que la especie *Nannochloropsis* cultivada monoespecíficamente genera un porcentaje de remoción muy bueno, sin embargo, esto no se repite con las microalgas *Dunaliella* y *Tetraselmis*, ya que que estas al ser cultivadas en solitario tuvieron un porcentaje de remoción 20% menor que al ser co-cultivadas, de manera que se puede decir que el co-cultivo tuvo una influencia positiva en el porcentaje de remoción final.

En términos de velocidad de remoción fueron los co-cultivos D+N y D+N+T los que lograron el primer y segundo mejores porcentajes de remoción en el menor tiempo. Considerando entonces que los co-cultivos tuvieron el mejor desempeño tanto en velocidad como en porcentaje de remoción, se puede afirmar que el co-cultivo tuvo un efecto positivo sobre la capacidad de las microalgas para disminuir la concentración de la DQO.

Para el peso seco se encontró que fue el cultivo monoespecífico N, el que tuvo la mayor concentración final de biomasa, así como la mayor productividad y tasa de crecimiento específico ( $52.08 \text{ mg L}^{-1} \text{ Día}^{-1}$  y  $0.08 \text{ Día}^{-1}$ ). La segunda mejor concentración final la tuvieron los cultivos D+T, T+N, D+N y D los cuales tuvieron un peso seco final cercano a  $1 \text{ g L}^{-1}$  y no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Con esto en cuenta se puede ver que el proceso de co-cultivo no tuvo una influencia positiva notable en términos de productividad y concentración final de biomasa.

No obstante, hay que recordar que el cultivo T tuvo un crecimiento negativo a partir del octavo día de cultivo, lo que probablemente se debió a que las células de *Tetraselmis chui* en el medio comenzaron a morir a partir de ese punto. Este fenómeno no se observó en ninguno de los co-cultivos donde la microalga *T. chui* estuvo presente, lo que sugiere que, aunque la población de *T. chui* decayera

durante el cultivo, alguna de las otras microalgas presentes mantuvo el crecimiento de la biomasa evitando que este se volviera negativo, lo cual en teoría es una de las ventajas que tienen los co-cultivos sobre los cultivos monoespecíficos (Choudhary *et al.*, 2016).

Para los lípidos se encontró que fueron los cultivos D y D+N los que tuvieron las mayores concentraciones finales de lípidos con 97.8 y 110.4 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, estos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Es necesario resaltar que el cultivo con la tercer mejor concentración final fue el cultivo N con 71.7 mg L<sup>-1</sup>. Considerando esto, se puede afirmar que el co-cultivo no tuvo una influencia considerable en términos de concentración final de lípidos, no obstante, en términos de productividad este exhibió un efecto positivo ya que el co-cultivo D+N fue el que registró la productividad y porcentaje en peso seco mas altos.

En función de los objetivos de este proyecto y con base en los resultados obtenidos durante el estudio, se encontró que el co-cultivo causa diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en todos los parámetros registrados, pero estas diferencias no son necesariamente positivas o remarcadas.

En los casos del NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub> la influencia del co-cultivo fue positiva ya que los co-cultivos D+N+T, T+N lograron remover más del 85% de estas fracciones de nitrógeno durante los primeros días del experimento. Eso se reafirma considerando que los tratamientos que tuvieron los mejores porcentajes de remoción final de tales compuestos fueron en su mayoría co-cultivos.

En otros casos como el del PO<sub>4</sub>, la DQO el peso seco y la concentración de lípidos el proceso de co-cultivo no mejoró notablemente los porcentajes de remoción final obtenidos por las microalgas al ser cultivadas monoespecíficamente. En el caso particular de los fosfatos fue el cultivo monoespecífico D el que mostró el porcentaje de remoción más rápido en menor tiempo y para la DQO fue un co-cultivo el que logró lo mismo.

Se registró un fenómeno interesante en los cultivos de *Tetraselmis chui*, ya que esta microalga al ser cultivada monoespecíficamente mostró un crecimiento negativo en



biomasa durante los últimos días del experimento. Este crecimiento negativo no se encontró cuando *T. chui* era cultivada en conjunto con otras microalgas, lo cual sugiere que las otras microalgas presentes en el cultivo mantuvieron el crecimiento de la biomasa.

Se encontró que la concentración de nitrógeno total influye significativamente ( $\alpha=0.05$ ) en la concentración de lípidos en biomasa, ya que conforme disminuía el nitrógeno del medio aumentaba la concentración de lípidos. Todos los cultivos que registraron concentraciones superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de lípidos lo hicieron cuando la concentración de nitrógeno total era menor a  $33.9 \text{ mg L}^{-1}$  (remoción del 70%).

Se puede destacar que al cultivo D+N el cual removió el 80.8% del nitrógeno total en tres días y el 95.4% del  $\text{NH}_4$  en tres días. Siendo que el amonio es la fracción de nitrógeno inorgánico que tiene preferencia de consumo en muchas especies de microalgas, su disminución en el medio pudo desencadenar la producción de lípidos induciendo estrés por nitrógeno, lo que combinado con una concentración de biomasa mayor a podría  $1 \text{ mg L}^{-1}$  puede explicar porque el cultivo D+N fue el que mostró la concentración final de lípidos más alta con  $110.404 \text{ mg L}^{-1}$ .

Los diferentes cultivos de microalgas en este estudio redujeron las concentraciones de nitrógeno, fosforo y DQO presentes en el agua residual sintética, no existió un tratamiento que por sí mismo lograra hacerlo todo al mismo tiempo, ya que para cada parámetro hubo uno o varios cultivos que tuvieron mejor desempeño de remoción, esto se resume en la Tabla 97.

En este trabajo se consideró al cultivo con mejor porcentaje de remoción de cada parámetro (o concentración final más alta) como el tratamiento más eficiente, ya que hoy en día no existen regulaciones globales para la descarga de efluentes en la industria de la acuicultura, aunque también debe considerarse que la elección de alguno de estos cultivos como el mejor tratamiento, debe estar en función del objetivo que se quiera lograr, ya que, por ejemplo, el cultivo que remueve el mayor porcentaje de nitrógeno no es el mismo que produce la mayor concentración de lípidos o biomasa. Por lo cual, si fuese necesario implementar alguno de estos

cultivos en estudio futuro, se debería elegir al que realiza de mejor forma lo que sea de interés.

Tabla 97. Resumen de remociones y productividades.

	Menor % Remoción	Cultivos	Mayor % remoción	Remoción (mg L <sup>-1</sup> Día <sup>-1</sup> )	Cultivos	% remoción más rápido	Cultivos
<b>DQO</b>	82.9%	D	95.9-100%	17.3-18	D+N+T, D+T, N	100% en 5 días	D+N
<b>PO<sub>4</sub></b>	73.5%	N	98.6-100%	1-1.4	D, D+N, D+T, T, T+N	100% en 5 días	D
<b>NO<sub>3</sub></b>	70.6%	N	100%	4.8	D+N+T, D+T, T	92.9% en 5 días	D+N+T
<b>NO<sub>2</sub></b>	1.4%	T	100%	0.6	T+N	87.21% en 5 días	T+N
<b>NH<sub>4</sub></b>	75%	T	95.7-100%	6.4-9.1	T+N, D, N	95.45% en 3 días	D+N
	Concentración más baja	Cultivos	Productividad (mg L <sup>-1</sup> Día <sup>-1</sup> )	Concentración más alta			
<b>Lípidos</b>	35.9 mg L <sup>-1</sup>	T	6.8	110.4 (mg L <sup>-1</sup> )	D+N		
<b>Peso seco</b>	0.667 g L <sup>-1</sup>	T	52.1	1.151 (g L <sup>-1</sup> )	N		

La normatividad existente sobre el tema difiere dependiendo de cada país, puesto que, mientras algunos países establecen estándares de efluentes con límites máximos permitidos, otros aplican restricciones a la cantidad de alimento o agua que puede utilizarse en las granjas. La tendencia en general se decanta por la promoción de normas que mejoren las prácticas de manejo, de modo que se prevengan los impactos ambientales negativos y se tenga una producción económicamente viable, sin embargo, las prácticas de manejo no siempre son las mejores ni las más adecuadas para cada sitio de producción.

Aunque es difícil formular estándares de globales para efluentes debido a las diferencias en las condiciones hidrogeográficas, climáticas y ambientales dentro de los países y regiones, la Alianza Global de la Acuicultura (GAA, *Global Aquaculture Alliance*) y la Corporación Internacional de Finanzas (IFC, *International Finance Corporation*), han propuesto pautas para la calidad de agua de los efluentes de la

acuicultura (Tabla 98; Boyd, 2003). Es difícil llevar a la realidad estas normativas ya que su implementación depende de convencer a los productores, puesto que en muchas ocasiones para ellos es más rentable realizar el pago de multas por sobrepasar los límites permisibles, que la adopción de un sistema de tratamiento para sus efluentes.

Tabla 98. Límites permisibles de descarga en los efluentes provenientes de la acuicultura.

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

## VIII. CONCLUSIONES

Se evaluó y comparó la remoción de nutrientes, generación de biomasa y lípidos empleando monocultivos de las microalgas salinas *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis chui*, así como de sus co-cultivos en experimentos de laboratorio, bajo condiciones controladas, empleando agua que simula la calidad de un efluente residual de camaronicultura.

Se evaluó al co-cultivo como una estrategia para optimizar el proceso de remoción de nutrientes y la producción de biomasa/lípidos de las tres especies de microalgas estudiadas.

La hipótesis planteada resultó negativa, ya que al emplear co-cultivos de microalgas no siempre se logró mejorar la respuesta de remoción de nutrientes, generación de biomasa y acumulación de lípidos, empleando aguas que simulan un efluente de acuicultura, con respecto al empleo de monocultivos.

El tratamiento con mejor desempeño de todos fue el co-cultivo D+N, ya que este tuvo los porcentajes de remoción más altos en la mayoría de los nutrientes evaluados y también estuvo entre los cultivos con las productividades más altas de lípidos y biomasa.

## **IX. PERSPECTIVAS**

- Basado en los datos obtenidos en este estudio, se recomienda hacer trabajos de bioprospección con diferentes mezclas de microalgas para poder detectar aquellas con las características adecuadas para integrar la obtención de productos de valor agregado con la depuración de efluentes de acuicultura.
- Se recomienda llevar los experimentos a una escala de cultivo piloto con condiciones de crecimiento menos controladas, esto con el objetivo de observar la respuesta de los co-cultivos a variables ambientales no contempladas en este estudio.
- Asimismo, futuros trabajos en esta línea deben plantearse dentro del marco de los sistemas integrados de acuicultura multitrófica, ya que este tipo de estudios podrían ayudar a mejorar la eficiencia de tales sistemas.

## BIBLIOGRAFIA

Abdullah, A. N., B. Myers, N. Stacey, K. K. Zander y S. T. Garnett. 2017. The impact of the expansion of shrimp aquaculture on livelihoods in coastal Bangladesh. *Environment, Development and Sustainability*, 19(5): 2093-2114.

Alonso-Rodriguez, R. y F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219(1-4): 317-336.

Anh, P. T., C. Kroeze, S.R. Bush, S & A. P. Mol. 2010. Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management*, 97(6): 872-882.

Arredondo-Vega y D. Voltolina. 2007. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. México. 97 pp.

Asif, M. B., F. I. Hai, W. E. Price y L. D. Nghiem. 2018. Impact of Pharmaceutically Active Compounds in Marine Environment on Aquaculture. In *Sustainable Aquaculture* (pp. 265-299). Springer, Cham.

Becker, E. W. 1994. Measurement of algal growth. *Microalgae biotechnology and microbiology*, 56-62.

Benvenuti, G., R. Bosma, M. Cuaresma, M. Janssen, M. J. Barbosa y R. H. Wijffels. 2015. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *Journal of Applied Phycology*. 27, 1425–1431.

Boopathy, R. 2009. Biological treatment of shrimp production wastewater. *Journal of industrial microbiology y biotechnology*, 36(7): 989.

Boyd, C. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226(1-4): 101-112.

Boyd, C. y A. McNevin. 2014. *Aquaculture, resource use, and the environment*. John Wiley y Sons. USA. 337 pp.

Breuer, G., P. P. Lamers, D. E. Martens, R. B. Draaisma y R. H. Wijffels. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*. 124, 217-226.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*. 25(3): 294-306.

Chokshi, K., I. Pancha, A. Ghosh y S. Mishra. 2017. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*. 10(1): 60.

- Choudhary, P., S. K. Prajapati y A. Malik. 2016. Screening native microalgal consortia for biomass production and nutrient removal from rural wastewaters for bioenergy applications. *Ecological Engineering*. 91, 221-230.
- Choudhary, P., S.K. Prajapati y A. Malik. 2016. Screening native microalgal consortia for biomass production and nutrient removal from rural wastewaters for bioenergy applications. *Ecological Engineering*. 91, 221-230.
- Clairin-Savage, S. 2019. Efecto en el contenido de clorofila y ácidos grasos en 3 especies de microalgas marinas sometidas a estrés por detrimento de nutrientes. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 116 pp.
- De La Peña, E., J. Ducci y V. Z. Plascencia, V. Z. 2013. Tratamiento de aguas residuales en México. México. Banco Interamericano de Desarrollo, Sector de Infraestructura y Medio Ambiente: 42.
- Donhui S., Xi, B., y J. Sun. 2016. Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Ocean University of China*. 15(1): 124-130.
- Fon-Sing, S. y M. A. Borowitzka. 2016. Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of applied phycology*. 28(1): 1-14
- Fox, J. W. 2004. Effects of algal and herbivore diversity on the partitioning of biomass within and among trophic levels. *Ecology*. 85(2): 549-559.
- Francisco, E. C., D. B., Neves, E., Jacob-Lopes y T. T Franco, 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85(3): 395-403.
- Gangl, D., J. A. Z. Zedler, P. D. Rajakumar, E. M. R. Martinez, A. Riseley, A. Włodarczyk y C. Robinson 2015. Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66, 6975–6990.
- Gómez, O., R. Rodríguez y S. Subero. 2011. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chui*) en medios nutritivos no convencionales. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 23(1): 84-90.
- Gómez, O., R. Rodríguez y S. Subero. 2011. Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chui*) en medios nutritivos no convencionales. *Revista Multidisciplinaria Del Consejo de Investigación de La Universidad de Oriente*. 23(1): 84-90.

- Goncalves, E. C., J. Koh, N. Zhu, M.J. Yoo, S. Chen, T. Matsuo y B. Rathinasabapathi. 2016. Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *The Plant Journal*. 85, 743-757.
- Gouveia, L. y A.C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 36(2): 269-274.
- Grasshoff, K., K. Kremling y M. Ehrhardt. 1999. *Methods of seawater analysis*. John Wiley y Sons. USA. 600 pp.
- Gu, N., Q. Lin, G. Li, Y. Tan, L. Huang y J. Lin. 2012. Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Engineering in life sciences*. 12(6): 631-637.
- Harache, Y. 2002. Development and diversification issues in aquaculture. A historical and dynamic view of fish culture diversification. *Seafood market studies for the introduction of new aquaculture products*. CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes, (59), 15-23.
- Hena, S., S. Fatimah y S. Tabassum. 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 10, 1-14.
- Herath, S. S. y S. Satoh. 2015. Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. 369-386.
- Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang y G. Chen. 2009. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. 87, 38-46.
- Huerlimann, R., R. De Nys y K. Heimann. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and bioengineering*. 107(2): 245-257.
- Jackson, C., N. Preston, P.J. Thompson y M. Burford. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, 218(1-4): 397-411.
- Jiang, L., S. Luo, X. Fan, Z. Yang y R. Guo. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Applied energy*. 88(10): 3336-3341.
- Jones, A. C., A. Mead, M.J. Kaiser, M.C. Austen, A.W. Adrian, N.A. Auchterlonie y G.M. Burnell. 2015. Prioritization of knowledge needs for sustainable aquaculture: a national and global perspective. *Fish and fisheries*, 16(4): 668-683.
- Ju, Z. Y., D. F. Deng y W. Dominy. 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture*, 354: 50-55.



- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191(1-3): 145-161.
- Kazamia, E., D. C., Aldridge y A. G. Smith .2012. Synthetic ecology—a way forward for sustainable algal biofuel production?. *Journal of Biotechnology*. 162(1): 163-169.
- Kern, C. y R. Boopathy, R. 2012. Use of sequencing batch reactor in the treatment of shrimp aquaculture wastewater. *Journal of Water Sustainability*, 2(4): 221-232.
- Kim, G., C. H. Lee y K. Lee. 2016. Enhancement of lipid production in marine microalga *Tetraselmis* sp. through salinity variation. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 33(1): 230-237.
- Kim, G., J. Bae y K. Lee. 2016. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource technology*. 205: 274-279.
- Koller, M., A. Muhr y G. Braunegg. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*. 6, 52-63.
- Kroes, H. W. 1971. Growth interactions between *Chlamydomonas globosa* Snow and *Chlorococcum ellipsoideum* Deason and Bold under different experimental conditions, with special attention to the role of pH. *Limnology and Oceanography*. 16(6): 869-879.
- Kruskopf, M. & K. J. Flynn. 2006. Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. *New Phytologist*. 169(3): 525-536.
- Kuhn, D. D., A. L. Lawrence, J. Crockett, y D. Taylor. 2016. Evaluation of bioflocs derived from confectionary food effluent water as a replacement feed ingredient for fishmeal or soy meal for shrimp. *Aquaculture*, 454: 66-71.
- Lauritano, C., D. De Luca, M. Amoroso, S. Benfatto, S. Maestri, C. Racioppi... & A. Lanora. 2019. New molecular insights on the response of the green alga *Tetraselmis suecica* to nitrogen starvation. *Scientific reports*. 9(1): 3336.
- Lee, S. J., S. Go, G. T. Jeong y S. K. Kim. 2011. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(3), 561-566.
- León-Bañares, R., D. González-Ballester, A. Galván y E. Fernández. 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biotechnology*. 22(1): 45-52.
- Loring, P. A., S. C. Gerlach, H. P. Huntington y H. Consulting. 2013. The new environmental security: Linking food, water, and energy for integrative and

diagnostic social-ecological research. *Journal of Agriculture, Food Systems, and Community Development*. 3, 55–61.

Luo, Y., P. Le-Clech y R. K. Henderson. 2017. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review. *Algal Research*. 24: 425-437.

Mata, T. M., A. Nio, A. Martins y N.S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(1): 217-232.

McIntosh, D. y Fitzsimmons, K. (2003). Characterization of effluent from an inland, low-salinity shrimp farm: what contribution could this water make if used for irrigation. *Aquacultural Engineering*, 27(2), 147-156.

Mishra, S. K., W. I. Suh, W. Farooq, M. Moon, A. Shrivastav, M. S. Park y J. W. Yang. 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*. 155, 330-333.

Moazami, N., R. Ranjbar, A. Ashori, M. Tangestani y A. S. Nejad. 2011. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *biomass and bioenergy*. 35(5), 1935-1939.

Nascimento, I. A., S.S.I. Marques, I.T.D. Cabanelas, S.A. Pereira, J.I. Druzian, C.O. de Souza y M.A. Nascimento. 2013. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, 6, 1–13.

Naylor, R. L., R.J. Goldburg, J.H. Primavera, N. Kautsky, M.C. Beveridge, J. Clay y M. Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790): 1017.

Newby, D. T., T. J. Mathews, R. C. Pate, M. H. Huesemann, T. W. Lane, B. D. Wahlen, ... y J. B. Shurin. 2016. Assessing the potential of polyculture to accelerate algal biofuel production. *Algal Research*. 19: 264-277.

Olguín, E. J. 2003. Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. In *Biotechnology Advances*. 22(1-2): 81-91.

Páez Osuna, F., G. R. Reséndiz, A. C. Fernández y M. F. Soto. 2007. *La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: flujos, fuentes, efectos y opciones de manejo*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 305 pp.

Páez-Osuna, F. 2001. The environmental impact of shrimp aquaculture: Causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management*. 28(1): 131-140.

Páez-Osuna, F., A. Gracia, F. Flores-Verdugo, L.P. Lyle-Fritch, R. Alonso-Rodríguez, Roque, A. y A.C. Ruiz-Fernández. 2003. Shrimp aquaculture

development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*, 46(7): 806-815.

Páez-Osuna, F., S. R. Guerrero-Galván y A.C. Ruiz-Fernández, A. C. 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 36(1): 65-75.

Páez-Osuna, F., S. R. Guerrero-Galván y A.C. Ruiz-Fernández. 1999. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 38(7): 585-592.

Park, K. C., C. G. E. Whitney, C. Kozera, S. J. B. O'Leary y P. J. McGinn. 2015. Seasonal isolation of microalgae from municipal wastewater for remediation and biofuel applications. *Journal of Applied Microbiology*. 119(1): 76-87.

Parsons, T. R., K. Stephens y J. D. H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 18(6): 1001-1016.

Rawat, I., R.R. Kumar, T. Mutanda y F. Bux. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88(10): 3411-3424.

Rawat, I., S. K. Gupta, A. Shrivastav, P. Singh, S. Kumari y F. Bux. 2016. Microalgae Applications. In *Wastewater Treatment*. pp. 249-268.

Rojas, R. 2002. Sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Gestión Integral de Tratamiento de Aguas Residuales*, 1(1): 8-15.

Sacristán De Alva, M. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas empleando diferentes calidades de agua. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 115 páginas.

Sacristán de Alva, M., V. M. Pabello, M. T. O. Ledesma y M. J. C. Gómez. 2018. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. *Algal Research*, 34: 97-103.

Sacristán de Alva, M., V. M. Luna-Pabello, E. Cadena y E. Ortíz .2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 146, 744-748.

Sahay, S. y V. J. Braganza. 2016. Microalgae based biodiesel production – current and future scenario. *Journal of Experimental Sciences*. 7, 31–35.

Salusso, M. M., y L. B. Moraña. 2014. Fitoplancton de embalses subtropicales del noroeste argentino. *Gestión y Ambiente*. 17(1), 209.

- Samocha, T. M., D.A. Davis, I.P. Saoud y K. DeBault. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 231(1-4): 197-203.
- Schenk, P. M., S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussnug, C. Posten,... & B. Hankamer. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research* 1(1): 20-43.
- Sheehan, J., T. Dunahay, J. Benemann y P. Roessler. 1998. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. United States. 328 pp.
- Shen, Q. H., Y. P. Gong, W. Z. Fang, Z. C. Bi, L. H. Cheng, X. H. Xu y H. L. Chen. 2015. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. *Bioresource technology*, 193, 68-75.
- Shi, J., B. Podola y M. Melkonian. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: An experimental study. *Journal of Applied Phycology*. 19(5): 417-423.
- Shurin, J. B., R. L. Abbott, M. S. Deal, G.T. Kwan, E. Litchman, E., R. C. McBride... y V. H. Smith. 2013. Industrial-strength ecology: trade-offs and opportunities in algal biofuel production. *Ecology letters*. 16(11): 1393-1404.
- Smith, V. H. y Crews, T. 2014. Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. *Algal Research*. 4: 23-34.
- Smith, V. H. y T. Crews. 2014. Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. *Algal Research*. 4, 23-34.
- Sriram, S. y R. Seenivasan. 2012. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. *Algal Biomass Utln*. 3(2): 9-13.
- Su, C. H., L. J. Chien, J. Gomes, Y. S. Lin, Y. K. Yu, J. S. Liou y R. J. Syu. 2011. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*. 23(5): 903-908.
- Thakur, D. P. y C. K. Lin .2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural engineering*, 27(3): 159-176.
- Tilley, D. R., H. Badrinarayanan, R. Rosati y J. Son. 2002. Constructed wetlands as recirculation filters in large-scale shrimp aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 26(2): 81-109.
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E. y S. Revah. 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource technology*. 130, 652-658.

- Tovar, A., C. Moreno, M. P. Manuel-Vez y M. García-Vargas. 2000. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Research*, 34(1): 334-342.
- Van Den Hende, S., V. Beelen, G. Bore, N. Boon y H. Vervaeren. 2014. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresource Technology*. 159, 342-354.
- Van Vooren, G., F. Le Grand, J. Legrand, S. Cui  , G. Peltier y J. Pruvost. 2012. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124: 421-432.
- Vyrides, I. y D. C. Stuckey. 2009. A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics. *Bioresource technology*. 100(2): 979-982.
- Weldy, C. S. T M. Huesemann. 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *Journal of undergraduate research*. 7:115–122.
- Zhao, L., Y. Qi y G. Chen. 2015. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from seawater. *Bioresource Technology*. 184, 42-46.
- Zhao, L., Y. Qi y G. Chen. 2015. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from seawater. *Bioresource Technology*. 184, 42-46.
- Zhu, L., Z. Wang, Q. Shu, J. Takala, E. Hiltunen, P. Feng y Z. Yuan. 2013. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Research*. 47(13): 4294-4302.

## ANEXO

Tabla Anexo 1. Estadísticos de contraste para modelos lineales de PO<sub>4</sub>

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
C - D	0.224	0.052	171	4.288	0.001	<b>C</b>	2.712	-0.008	0.561
C - D+N	0.345	0.052	171	6.616	<.0001	<b>I</b>	2.754	0.000	1.000
C - D+N+T	0.178	0.052	171	3.414	0.0222	<b>D</b>	1.132	-0.231	0.377
C - D+T	0.299	0.052	171	5.728	<.0001	<b>D+N</b>	2.112	-0.353	0.763
C - I	-0.008	0.052	171	-0.152	1	<b>D+N+T</b>	2.667	-0.186	0.762
C - N	0.061	0.052	171	1.178	0.9602	<b>D+T</b>	2.614	-0.306	0.915
C - T	0.318	0.052	171	6.095	<.0001	<b>N</b>	2.635	-0.069	0.771
C - T+N	0.402	0.052	171	7.722	<.0001	<b>T</b>	2.407	-0.326	0.601
D - D+N	0.121	0.052	171	2.327	0.3318	<b>T+N</b>	2.984	-0.410	0.824
D - D+N+T	-0.046	0.052	171	-0.874	0.994				
D - D+T	0.075	0.052	171	1.440	0.8807				
D - I	-0.231	0.052	171	-4.440	0.0005				
D - N	-0.162	0.052	171	-3.111	0.0546				
D - T	0.094	0.052	171	1.807	0.6775				
D - T+N	0.179	0.052	171	3.433	0.0209				
D+N - D+N+T	-0.167	0.052	171	-3.202	0.0421				
D+N - D+T	-0.046	0.052	171	-0.888	0.9934				
D+N - I	-0.353	0.052	171	-6.768	<.0001				
D+N - N	-0.283	0.052	171	-5.438	<.0001				
D+N - T	-0.027	0.052	171	-0.520	0.9999				
D+N - T+N	0.058	0.052	171	1.106	0.9727				
D+N+T - D+T	0.121	0.052	171	2.314	0.3396				
D+N+T - I	-0.186	0.052	171	-3.566	0.0136				
D+N+T - N	-0.117	0.052	171	-2.236	0.3873				
D+N+T - T	0.140	0.052	171	2.682	0.1624				
D+N+T - T+N	0.225	0.052	171	4.308	0.0009				
D+T - I	-0.306	0.052	171	-5.880	<.0001				
D+T - N	-0.237	0.052	171	-4.550	0.0003				
D+T - T	0.019	0.052	171	0.367	1				
D+T - T+N	0.104	0.052	171	1.994	0.55				
I - N	0.069	0.052	171	1.330	0.9211				
I - T	0.326	0.052	171	6.247	<.0001				
I - T+N	0.410	0.052	171	7.874	<.0001				
N - T	0.256	0.052	171	4.918	0.0001				
N - T+N	0.341	0.052	171	6.544	<.0001				
T - T+N	0.085	0.052	171	1.626	0.7892				

$\alpha = 0.05$ .

Tabla Anexo 2. Estadísticos de contraste para modelos lineales de NH<sub>4</sub>.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
<b>C - D</b>	0.255	0.069	171	3.686	0.0091	<b>C</b>	4.675	-0.004	0.108
<b>C - D+N</b>	0.167	0.069	171	2.412	0.2842	<b>I</b>	4.702	0.000	1.000
<b>C - D+N+T</b>	0.130	0.069	171	1.886	0.6244	<b>D</b>	5.048	-0.259	0.719
<b>C - D+T</b>	0.131	0.069	171	1.901	0.6139	<b>D+N</b>	2.471	-0.171	0.067
<b>C - I</b>	-0.004	0.069	171	-0.062	1	<b>D+N+T</b>	4.475	-0.135	0.840
<b>C - N</b>	0.283	0.069	171	4.098	0.0021	<b>D+T</b>	4.520	-0.136	0.805
<b>C - T</b>	0.074	0.069	171	1.078	0.9767	<b>N</b>	4.961	-0.287	0.481
<b>C - T+N</b>	0.485	0.069	171	7.016	<.0001	<b>T</b>	4.373	-0.079	0.501
<b>D - D+N</b>	-0.088	0.069	171	-1.273	0.9377	<b>T+N</b>	4.802	-0.489	0.780
<b>D - D+N+T</b>	-0.124	0.069	171	-1.800	0.6824				
<b>D - D+T</b>	-0.123	0.069	171	-1.784	0.6924				
<b>D - I</b>	-0.259	0.069	171	-3.747	0.0074				
<b>D - N</b>	0.028	0.069	171	0.412	1				
<b>D - T</b>	-0.180	0.069	171	-2.608	0.1912				
<b>D - T+N</b>	0.230	0.069	171	3.330	0.0287				
<b>D+N - D+N+T</b>	-0.036	0.069	171	-0.526	0.9998				
<b>D+N - D+T</b>	-0.035	0.069	171	-0.511	0.9999				
<b>D+N - I</b>	-0.171	0.069	171	-2.474	0.2522				
<b>D+N - N</b>	0.116	0.069	171	1.686	0.7545				
<b>D+N - T</b>	-0.092	0.069	171	-1.334	0.9196				
<b>D+N - T+N</b>	0.318	0.069	171	4.604	0.0003				
<b>D+N+T - D+T</b>	0.001	0.069	171	0.015	1				
<b>D+N+T - I</b>	-0.135	0.069	171	-1.948	0.5818				
<b>D+N+T - N</b>	0.153	0.069	171	2.212	0.4028				
<b>D+N+T - T</b>	-0.056	0.069	171	-0.808	0.9965				
<b>D+N+T - T+N</b>	0.354	0.069	171	5.130	<.0001				
<b>D+T - I</b>	-0.136	0.069	171	-1.963	0.5711				
<b>D+T - N</b>	0.152	0.069	171	2.197	0.4127				
<b>D+T - T</b>	-0.057	0.069	171	-0.823	0.996				
<b>D+T - T+N</b>	0.353	0.069	171	5.115	<.0001				
<b>I - N</b>	0.287	0.069	171	4.160	0.0016				
<b>I - T</b>	0.079	0.069	171	1.140	0.9672				
<b>I - T+N</b>	0.489	0.069	171	7.078	<.0001				
<b>N - T</b>	-0.209	0.069	171	-3.020	0.0701				
<b>N - T+N</b>	0.202	0.069	171	2.918	0.0916				
<b>T - T+N</b>	0.410	0.069	171	5.938	<.0001				

α= 0.05.

Tabla Anexo 3. Estadísticos de contraste para modelos lineales de NO<sub>2</sub>.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
<b>C - D</b>	0.040	0.020	171	1.998	0.5471	<b>C</b>	1.926	-0.002	-0.022
<b>C - D+N</b>	0.067	0.020	171	3.359	0.0263	<b>I</b>	2.028	0.000	1.000
<b>C - D+N+T</b>	0.039	0.020	171	1.945	0.5835	<b>D</b>	2.108	-0.042	0.220
<b>C - D+T</b>	0.059	0.020	171	2.916	0.0921	<b>D+N</b>	2.457	-0.070	0.432
<b>C - I</b>	-0.002	0.020	171	-0.107	1	<b>D+N+T</b>	1.926	-0.041	0.178
<b>C - N</b>	0.033	0.020	171	1.647	0.7773	<b>D+T</b>	2.075	-0.061	0.906
<b>C - T</b>	-0.016	0.020	171	-0.786	0.9971	<b>N</b>	1.723	-0.035	0.374
<b>C - T+N</b>	0.318	0.020	171	15.816	<.0001	<b>T</b>	2.221	0.014	0.009
<b>D - D+N</b>	0.027	0.020	171	1.361	0.9107	<b>T+N</b>	1.868	-0.320	0.887
<b>D - D+N+T</b>	-0.001	0.020	171	-0.052	1				
<b>D - D+T</b>	0.018	0.020	171	0.918	0.9917				
<b>D - I</b>	-0.042	0.020	171	-2.104	0.4738				
<b>D - N</b>	-0.007	0.020	171	-0.351	1				
<b>D - T</b>	-0.056	0.020	171	-2.784	0.1278				
<b>D - T+N</b>	0.277	0.020	171	13.819	<.0001				
<b>D+N - D+N+T</b>	-0.028	0.020	171	-1.413	0.8914				
<b>D+N - D+T</b>	-0.009	0.020	171	-0.443	1				
<b>D+N - I</b>	-0.070	0.020	171	-3.465	0.0188				
<b>D+N - N</b>	-0.034	0.020	171	-1.712	0.7387				
<b>D+N - T</b>	-0.083	0.020	171	-4.145	0.0017				
<b>D+N - T+N</b>	0.250	0.020	171	12.458	<.0001				
<b>D+N+T - D+T</b>	0.019	0.020	171	0.971	0.988				
<b>D+N+T - I</b>	-0.041	0.020	171	-2.052	0.5097				
<b>D+N+T - N</b>	-0.006	0.020	171	-0.298	1				
<b>D+N+T - T</b>	-0.055	0.020	171	-2.732	0.1447				
<b>D+N+T - T+N</b>	0.278	0.020	171	13.871	<.0001				
<b>D+T - I</b>	-0.061	0.020	171	-3.023	0.0696				
<b>D+T - N</b>	-0.025	0.020	171	-1.269	0.9389				
<b>D+T - T</b>	-0.074	0.020	171	-3.702	0.0086				
<b>D+T - T+N</b>	0.259	0.020	171	12.901	<.0001				
<b>I - N</b>	0.035	0.020	171	1.754	0.7122				
<b>I - T</b>	-0.014	0.020	171	-0.680	0.999				
<b>I - T+N</b>	0.320	0.020	171	15.923	<.0001				
<b>N - T</b>	-0.049	0.020	171	-2.433	0.2729				
<b>N - T+N</b>	0.284	0.020	171	14.169	<.0001				
<b>T - T+N</b>	0.333	0.020	171	16.603	<.0001				

α= 0.05.



Tabla Anexo 4. Estadísticos de contraste para modelos lineales de NO<sub>3</sub>.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
C - D	0.265	0.052	171	5.065	<.0001	C	4.293	-0.002	0.471
C - D+N	0.149	0.052	171	2.837	0.1125	I	4.297	0.000	1.000
C - D+N+T	0.464	0.052	171	8.851	<.0001	D	4.862	-0.267	0.648
C - D+T	0.409	0.052	171	7.794	<.0001	D+N	4.576	-0.150	0.865
C - I	-0.002	0.052	171	-0.029	1	D+N+T	4.617	-0.465	0.715
C - N	0.087	0.052	171	1.654	0.7731	D+T	5.283	-0.410	0.817
C - T	0.417	0.052	171	7.957	<.0001	N	4.204	-0.088	0.776
C - T+N	0.121	0.052	171	2.312	0.3411	T	4.783	-0.419	0.682
D - D+N	-0.117	0.052	171	-2.228	0.3924	T+N	4.408	-0.123	0.887
D - D+N+T	0.198	0.052	171	3.786	0.0064				
D - D+T	0.143	0.052	171	2.730	0.1454				
D - I	-0.267	0.052	171	-5.093	<.0001				
D - N	-0.179	0.052	171	-3.411	0.0224				
D - T	0.152	0.052	171	2.893	0.0978				
D - T+N	-0.144	0.052	171	-2.753	0.1376				
D+N - D+N+T	0.315	0.052	171	6.014	<.0001				
D+N - D+T	0.260	0.052	171	4.958	0.0001				
D+N - I	-0.150	0.052	171	-2.865	0.1048				
D+N - N	-0.062	0.052	171	-1.182	0.9592				
D+N - T	0.268	0.052	171	5.121	<.0001				
D+N - T+N	-0.028	0.052	171	-0.525	0.9998				
D+N+T - D+T	-0.055	0.052	171	-1.057	0.9794				
D+N+T - I	-0.465	0.052	171	-8.880	<.0001				
D+N+T - N	-0.377	0.052	171	-7.197	<.0001				
D+N+T - T	-0.047	0.052	171	-0.894	0.9931				
D+N+T - T+N	-0.343	0.052	171	-6.539	<.0001				
D+T - I	-0.410	0.052	171	-7.823	<.0001				
D+T - N	-0.322	0.052	171	-6.140	<.0001				
D+T - T	0.009	0.052	171	0.163	1				
D+T - T+N	-0.287	0.052	171	-5.483	<.0001				
I - N	0.088	0.052	171	1.683	0.7562				
I - T	0.419	0.052	171	7.986	<.0001				
I - T+N	0.123	0.052	171	2.340	0.3243				
N - T	0.330	0.052	171	6.303	<.0001				
N - T+N	0.034	0.052	171	0.657	0.9992				
T - T+N	-0.296	0.052	171	-5.646	<.0001				

α= 0.05.

Tabla Anexo 5. Estadísticos de contraste para modelos lineales de DQO.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
C - D	0.142	0.109	171	1.310	0.9271	C	5.588	-0.003	0.228
C - D+N	0.141	0.109	171	1.301	0.93	I	5.599	0.000	1.000
C - D+N+T	0.594	0.109	171	5.460	<.0001	D	5.292	-0.145	0.445
C - D+T	0.535	0.109	171	4.917	0.0001	D+N	2.264	-0.144	-0.010
C - I	-0.003	0.109	171	-0.028	1	D+N+T	5.801	-0.597	0.772
C - N	0.259	0.109	171	2.381	0.3014	D+T	7.044	-0.538	0.793
C - T	0.213	0.109	171	1.959	0.574	N	5.956	-0.262	0.467
C - T+N	0.163	0.109	171	1.500	0.8544	T	5.106	-0.216	0.119
D - D+N	-0.001	0.109	171	-0.010	1	T+N	5.422	-0.166	0.725
D - D+N+T	0.451	0.109	171	4.150	0.0017				
D - D+T	0.392	0.109	171	3.607	0.0119				
D - I	-0.145	0.109	171	-1.338	0.9183				
D - N	0.116	0.109	171	1.071	0.9776				
D - T	0.071	0.109	171	0.649	0.9993				
D - T+N	0.021	0.109	171	0.189	1				
D+N - D+N+T	0.452	0.109	171	4.159	0.0016				
D+N - D+T	0.393	0.109	171	3.617	0.0115				
D+N - I	-0.144	0.109	171	-1.329	0.9214				
D+N - N	0.117	0.109	171	1.080	0.9764				
D+N - T	0.072	0.109	171	0.658	0.9992				
D+N - T+N	0.022	0.109	171	0.199	1				
D+N+T - D+T	-0.059	0.109	171	-0.542	0.9998				
D+N+T - I	-0.597	0.109	171	-5.488	<.0001				
D+N+T - N	-0.335	0.109	171	-3.079	0.0596				
D+N+T - T	-0.381	0.109	171	-3.501	0.0168				
D+N+T - T+N	-0.431	0.109	171	-3.960	0.0034				
D+T - I	-0.538	0.109	171	-4.945	0.0001				
D+T - N	-0.276	0.109	171	-2.537	0.2222				
D+T - T	-0.322	0.109	171	-2.958	0.0825				
D+T - T+N	-0.372	0.109	171	-3.418	0.0219				
I - N	0.262	0.109	171	2.409	0.286				
I - T	0.216	0.109	171	1.987	0.5546				
I - T+N	0.166	0.109	171	1.528	0.8411				
N - T	-0.046	0.109	171	-0.422	1				
N - T+N	-0.096	0.109	171	-0.881	0.9937				
T - T+N	-0.04994	0.109	171	-0.459	0.9999				

$\alpha = 0.05$ .

Tabla Anexo 6. Estadísticos de contraste para modelos lineales de Peso seco.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value	Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>	
C - D	-0.051	0.012	171	-4.373	0.0007	C	-4.925	0.002	0.130
C - D+N	-0.050	0.012	171	-4.274	0.001	D	-3.494	0.053	0.345
C - D+N+T	-0.055	0.012	171	-4.701	0.0002	D+N	0.316	0.052	0.360
C - D+T	-0.052	0.012	171	-4.427	0.0006	D+N+T	0.323	0.056	0.392
C - I	0.002	0.012	171	0.147	1	D+T	0.318	0.053	0.360
C - N	-0.071	0.012	171	-6.133	<.0001	I	-6.908	0.000	1.000
C - T	-0.030	0.012	171	-2.597	0.1956	N	-3.778	0.073	0.421
C - T+N	-0.053	0.012	171	-4.525	0.0004	T	-3.509	0.032	0.311
D - D+N	0.001	0.012	171	0.099	1	T+N	-3.554	0.054	0.357
D - D+N+T	-0.004	0.012	171	-0.327	1				
D - D+T	-0.001	0.012	171	-0.053	1				
D - I	0.053	0.012	171	4.520	0.0004				
D - N	-0.020	0.012	171	-1.759	0.7086				
D - T	0.021	0.012	171	1.776	0.6978				
D - T+N	-0.002	0.012	171	-0.152	1				
D+N - D+N+T	-0.005	0.012	171	-0.427	1				
D+N - D+T	-0.002	0.012	171	-0.153	1				
D+N - I	0.052	0.012	171	4.421	0.0006				
D+N - N	-0.022	0.012	171	-1.859	0.6428				
D+N - T	0.020	0.012	171	1.677	0.7599				
D+N - T+N	-0.003	0.012	171	-0.251	1				
D+N+T - D+T	0.003	0.012	171	0.274	1				
D+N+T - I	0.056	0.012	171	4.847	0.0001				
D+N+T - N	-0.017	0.012	171	-1.432	0.8839				
D+N+T - T	0.025	0.012	171	2.103	0.4745				
D+N+T - T+N	0.002	0.012	171	0.175	1				
D+T - I	0.053	0.012	171	4.574	0.0003				
D+T - N	-0.020	0.012	171	-1.706	0.7422				
D+T - T	0.021	0.012	171	1.830	0.6626				
D+T - T+N	-0.001	0.012	171	-0.098	1				
I - N	-0.073	0.012	171	-6.279	<.0001				
I - T	-0.032	0.012	171	-2.744	0.1406				
I - T+N	-0.054	0.012	171	-4.672	0.0002				
N - T	0.041	0.012	171	3.535	0.015				
N - T+N	0.018729	0.0117	171	1.607	0.7996				
T - T+N	-0.022463	0.0117	171	-1.928	0.5955				

$\alpha = 0.05$

Tabla Anexo 7. Estadísticos de contraste para modelos lineales de Lípidos.

Contrastes	Estimados	SE	df	t.ratio	p.value		Ordenada al origen	Pendiente	R <sup>2</sup>
C - D	-6.295	0.745	171	-8.450	<.0001	C	-2.30E+00	0	0.4857
C - D+N	-8.122	0.745	171	-10.901	<.0001	D	0.79515	6.3	0.4082
C - D+N+T	-3.828	0.745	171	-5.138	<.0001	D+N	-0.18327	8.12	0.642
C - D+T	-4.724	0.745	171	-6.340	<.0001	D+N+T	-1.14023	3.830	0.8052
C - I	0.000	0.745	171	0.000	1	D+T	-1.66012	4.720	0.9028
C - N	-4.175	0.745	171	-5.604	<.0001	I	-2.30E+00	0.000	1.000
C - T	-2.489	0.745	171	-3.341	0.0278	N	-0.14009	4.180	0.5579
C - T+N	-3.331	0.745	171	-4.471	0.0005	T	-0.29468	2.490	0.5378
D - D+N	-1.827	0.745	171	-2.452	0.2635	T+N	-0.21362	3.330	0.5823
D - D+N+T	2.467	0.745	171	3.312	0.0304				
D - D+T	1.572	0.745	171	2.110	0.4703				
D - I	6.295	0.745	171	8.450	<.0001				
D - N	2.120	0.745	171	2.846	0.11				
D - T	3.806	0.745	171	5.109	<.0001				
D - T+N	2.964	0.745	171	3.979	0.0032				
D+N - D+N+T	4.294	0.745	171	5.764	<.0001				
D+N - D+T	3.398	0.745	171	4.561	0.0003				
D+N - I	8.122	0.745	171	10.901	<.0001				
D+N - N	3.947	0.745	171	5.297	<.0001				
D+N - T	5.633	0.745	171	7.561	<.0001				
D+N - T+N	4.791	0.745	171	6.431	<.0001				
D+N+T - D+T	-0.896	0.745	171	-1.202	0.9551				
D+N+T - I	3.828	0.745	171	5.138	<.0001				
D+N+T - N	-0.347	0.745	171	-0.466	0.9999				
D+N+T - T	1.339	0.745	171	1.797	0.6841				
D+N+T - T+N	0.497	0.745	171	0.667	0.9991				
D+T - I	4.724	0.745	171	6.340	<.0001				
D+T - N	0.549	0.745	171	0.736	0.9982				
D+T - T	2.235	0.745	171	2.999	0.074				
D+T - T+N	1.393	0.745	171	1.869	0.6357				
I - N	-4.175	0.745	171	-5.604	<.0001				
I - T	-2.489	0.745	171	-3.341	0.0278				
I - T+N	-3.331	0.745	171	-4.471	0.0005				
N - T	1.686	0.745	171	2.263	0.3705				
N - T+N	0.844	0.745	171	1.133	0.9684				
T - T+N	-0.842	0.745	171	-1.13	0.9689				

$\alpha = 0.05$