



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN ENERGÍAS
RENOVABLES**

TESIS

**“Optimización del cultivo de microalgas en agua
residual sintética para la producción de biodiésel”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN MATERIALES Y SISTEMAS ENERGÉTICOS
RENOVABLES**

PRESENTA

Mtra. Paula Deyanira Orantes Calleja

DIRECTOR

Dr. Pascual López De Paz

CODIRECTOR

Dr. Arnulfo Rosales Quintero

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre de 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

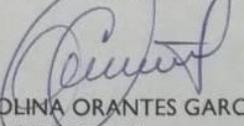
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 23 de noviembre de 2022
Oficio No. SA/DIP/888/2022
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Paula Deyanira Orantes Calleja
CVU CONACyT 715250
Candidata al Grado de Doctora en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables
Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables
UNICACH
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado Optimización del cultivo de microalgas en agua residual sintética para la producción de biodiésel cuyos Directores de tesis son el Dr. Pascual López de Paz (CVU 240828) y Dr. Arnulfo Rosales Quintero (CVU 100032) quienes avalan el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Doctora en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

ATENTAMENTE
"POR LA CULTURA DE MI RAZA"


DRA. CAROLINA ORANTES GARCÍA
DIRECTORA



C.c.p. Dr. Pascual López de Paz, Director del Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, UNICACH.
Para su conocimiento.
Dr. Héber Vilchis Bravo, Coordinador del Posgrado, Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables,
UNICACH. Para su conocimiento
Archivo/minutario.

RJAG/COG/eco/igp/igr

2022 Año de Ricardo Flores Magón
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA


Dirección de
Investigación
y Posgrado

Dirección de Investigación y Posgrado
Libramiento Norte Poniente No. 1150
Colonia Lajas Maciel. CP 29039,
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
Tel (961)6170440 Ext.4160
investigacionyposgrado@unicach.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante la estancia en la institución, cursando el doctorado, el cual fue primordial para lograr esta meta.

Al Instituto de Ciencia Tecnología e Innovación (ICTIECH), por el apoyo económico brindado para la “Conclusión de Estudios de Posgrado” dentro de la convocatoria de Apoyos Únicos otorgados a los integrantes del Sistema Estatal de Investigadores 2022, el cual fue de gran ayuda para poder realizar los trámites para presentar este proyecto de investigación en tiempo y forma, según lo establecido.

Gracias de corazón a mi director de tesis al Dr. Pascual López de Paz, así como a mi codirector, el Dr. Arnulfo Rosales Quintero y mis revisores, el Dr. Carlos Meza Avendaño, Dra. Laura Elena Vereá Valladares y Dr. Héber Vilchis Bravo, por su dedicación, apoyo, paciencia y tiempo brindado. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A todo el personal administrativo en la UNICACH que dedicó su tiempo en atenderme amablemente en lo relativo a la escuela. A los maestros que se encargaron de mi formación y la de mis compañeros durante el doctorado.

Gracias a la carrera de Ingeniería Bioquímica y al Instituto Tecnológico Nacional por permitirme usar sus instalaciones, así como los equipos y reactivos de los laboratorios de esta institución. Al Dr. Arnulfo Rosales Quintero, nuevamente, por el acceso facilitado a dicha casa de estudios y su amable apoyo en todo lo relacionado con esta investigación. A los laboratorios de Ingeniería en Energías por el uso de sus instalaciones, equipos y reactivos.

Finalmente, agradezco a dios y a mi familia por su apoyo y amor.

DEDICATORIA

La tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi familia y en especial a mi hijo al que adoro, mi motor en la vida para seguir adelante.

A mis sueños cumplidos y por cumplir y a la vida que siempre ha sido sabia y buena.

Resumen

Entre los principales problemas que enfrenta actualmente la humanidad, destacan el deterioro ambiental y la crisis energética, por lo que es primordial la sustitución de los combustibles denominados fósiles o tradicionales, derivados del petróleo, por otros, derivados de la biomasa. Se piensa que una alternativa factible para reemplazar los derivados del petróleo es la producción de biocombustibles. Las microalgas han sido utilizadas para la producción de biocombustibles y su uso para generar biodiésel tiene grandes ventajas, ya que son especies con elevada eficiencia fotosintética, que se traduce en una velocidad de crecimiento y consumo de nutrientes relativamente altos; tienen elevadas productividades de lípidos, gran capacidad para crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, consumiendo los nutrientes presentes en estas y generando altas productividades de biomasa y compuestos de alto valor, como ácidos grasos, carbohidratos y pigmentos. El biodiésel es un biocombustible que está constituido por ésteres de metilo de ácidos grasos de cadena larga derivado de diversos tipos de aceite incluido el de microalgas, el cual debe cumplir con ciertas especificaciones técnicas para ser usado en motores diésel. Las ventajas del uso de microalgas para la producción de biodiésel, sobre otros tipos de biomasa, son: pueden ser cultivadas usando CO₂, lo que ayuda a la mitigación de GEI; el ciclo de cosecha de las microalgas es bastante corto y su tasa de crecimiento es alta, tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional y pueden ser cultivadas sobre tierras no productivas, como son los desiertos o las costas. Esta investigación tuvo como objetivo optimizar la concentración de amonio, fosfatos y luminosidad para el cultivo de la microalga *Leptolyngbya* sp. y *Chlorella* sp. en aguas residuales sintéticas, con la finalidad de analizar el consumo de nutrientes y su influencia en el rendimiento de biomasa y lípidos, utilizados para la producción de biodiésel. Se probaron diferentes condiciones de cultivo, tales como: a) estrés nutricional, b) fotoestrés, c) exceso de nutrientes, d) condiciones heterótrofas y e) condiciones mixotróficas. Los resultados indicaron un punto óptimo para el consumo de amonio y fosfatos de *Chlorella* sp., en la concentración de 58.82 mg L⁻¹, amonio, 30.17 mg L⁻¹, fosfatos y 3645.54 luxes de iluminación; mientras que para *Leptolyngbya* sp., en las concentraciones de 58.82 mg L⁻¹, amonio, 30.17 mg L⁻¹, fosfatos y 3645.54 luxes de iluminación. *Leptolyngbya* sp. presentó las mayores concentraciones de lípidos y biomasa. Usando la metodología de superficie de respuesta, se pudo predecir con éxito el consumo de amonio y fosfatos variando las concentraciones de iones de amonio y fosfato y la densidad de la luz.

Abstract

Among the main problems currently facing humanity, environmental deterioration and the energy crisis stand out, so it is essential to replace the so-called fossil or traditional fuels, derived from oil, by others, derived from biomass. It is thought that a feasible alternative to replace oil derivatives is the production of biofuels. Microalgae have been used for the production of biofuels and their use to generate biodiesel has great advantages, since they are species with a high photosynthetic efficiency, which translates into a relatively high growth rate and nutrient consumption; they have high lipid productivities, great capacity to grow in marine, fresh, waste and brackish waters, consuming the nutrients present in them and showing high biomass productivities and high-value compounds, such as fatty acids, carbohydrates and pigments. Biodiesel is a biofuel that is mixed with long-chain fatty acid methyl esters derived from various types of oil, including microalgae oil, which must meet certain technical specifications to be used in diesel engines. The advantages of using microalgae for biodiesel production, over other types of biomasses, are: they can be cultivated using CO₂, which helps to mitigate GHG; the microalgae harvest cycle is quite short and their growth rate is high, they have a much higher oil yield than any conventional crop and they can be cultivated on non-productive lands, such as deserts or coasts. This research aimed to optimize the concentration of ammonium, phosphates and light for the cultivation of the microalgae *Leptolyngbya* sp. and *Chlorella* sp. in synthetic wastewater, in order to analyze the consumption of nutrients and their influence on the yield of biomass and lipids, used for the production of biodiesel. Different culture conditions were tested, such as: a) nutritional stress, b) photostress, c) excess nutrients, d) heterotrophic conditions and e) mixotrophic conditions. The results indicated an optimal point for the consumption of ammonium and phosphates of *Chlorella* sp., in the concentration of 58.82 mg L⁻¹, ammonium, 30.17 mg L⁻¹, phosphates and 3645.54 luxes of illumination: while for *Leptolyngbya* sp., in the concentrations of 58.82 mg L⁻¹, ammonium, 30.17 mg L⁻¹, phosphates and 3645.54 luxes of illumination. *Leptolyngbya* sp. presented the highest concentrations of lipids and biomass. Using the response surface methodology, ammonium and phosphate consumption could be successfully predicted by varying the ammonium and phosphate ion concentrations and light density.

Índice

Capítulo 1 Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos	8
1.5. Hipótesis	8
Capítulo 2. Fundamentos Teórico	9
2.1. Microalgas	9
2.1.1. Clasificación	9
2.2. Fotosíntesis	11
2.2.1. Fotoinhibición	12
2.3. Aplicaciones	13
2.3.1. Energéticos	13
2.3.2. Salud humana y productos nutricionales	13
2.3.3. Ambientales	14
2.3.4. Otros usos	15
2.4. Las especies	15
2.5. Microalgas y lípidos	16
2.5.1. Definición y funciones metabólicas	16
2.5.2. Biosíntesis	17
2.5.3. Factores que determinan su producción	17
2.6. Lípidos y biodiésel	17
2.6.1. Biodiésel de microalgas	17
2.7. Proceso de producción de microalgas	18
2.7.1. Selección de la especie	18
2.7.2. Cultivo de microalgas	19
2.7.3. Principales factores de crecimiento	19
2.7.4. Sistemas de Cultivos	22
2.7.5. Cosecha de Microalgas	27
2.7.6. Extracción de lípidos	29

2.8. Ácidos grasos.....	31
2.8.1. Conversión de lípidos a biodiésel	31
2.9. Biorremediación ambiental con microalgas.....	32
Capítulo 3. Metodología.....	35
3.1. Aislamiento e identificación de las cepas.....	35
3.2. Cultivo de microorganismos y diseño experimental	35
3.3. Determinación del crecimiento de microorganismos.....	37
3.4. Determinación de clorofila	38
3.5. Eficiencia de remoción de nutrientes.....	38
3.5.1. Concentración de amonio (NH_4^+).....	39
3.5.2. Concentración de fosfatos (PO_4^{3-})	40
3.6. Extracción de lípidos	42
3.7. Perfil de ácidos grasos	42
3.8. Análisis estadístico.....	43
Capítulo 4. Resultados y discusión.....	44
4.1. Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Leptolyngbya</i> sp. en agua residual sintética	44
4.2. Remoción de nutrientes en agua residual sintética.....	47
4.3. Rendimiento de lípidos	49
4.4. Clorofila.....	51
4.5. Análisis del modelo de superficie de respuesta	52
4.6. Perfil de ácidos grasos y conversión a FAME.....	60
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones.....	62
Referencias bibliográficas	64

Índice de figuras

Figura 1. Productividad de aceite de las microalgas en comparación con los cultivos convencionales [16].	6
Figura 2. Microalgas agrupadas de acuerdo con su clasificación.	9
Figura 3. Reacciones de luz y de oscuridad en el proceso de la fotosíntesis.	11
Figura 4. Vista microscópica de la microalga <i>Chlorella</i> sp.	16
Figura 5. Vista microscópica de la cianobacteria <i>Leptolyngbya</i> sp.	16
Figura 6. Esquema general del proceso de producción de microalgas.	19
Figura 7. Variedad de sistemas de cultivo.	24
Figura 8. Proceso de transesterificación de triglicéridos a metil ésteres de ácidos grasos (biodiésel) [75].	32
Figura 9. Aislamiento por medio de diluciones seriadas en placas Petri con agar y medio BG11.	35
Figura 10. Cepario de microalgas.	36
Figura 11. Crecimiento de microalgas en reactores de 120 ml bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes.	37
Figura 12. Análisis de concentración de amonio y fosfatos.	38
Figura 13. Muestras pigmentadas para la realización de la curva de calibración de amonio (NH_4^+).	39
Figura 14. Curva de calibración de amonio (NH_4^+).	40
Figura 15. Muestras pigmentadas para la realización de la curva de calibración de fosfatos (PO_4^{3-}).	41
Figura 16. Curva de calibración de fosfatos (PO_4^{3-}).	41
Figura 17. Cinética de crecimiento de microalgas cultivadas durante 15 días.	45
Figura 18. Consumo de nutrientes (%) en agua residual sintética para la cianobacteria <i>Leptolyngbya</i> sp. y la microalga <i>Chlorella</i> sp.	48
Figura 19. Gráficas comparativas de la productividad de biomasa, de lípidos y la concentración inicial de amonio en los tratamientos.	50
Figura 20. Concentración de clorofila a y clorofila b en los tratamientos.	52
Figura 21. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para <i>Chlorella</i> sp.	57
Figura 22. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para <i>Leptolyngbya</i> sp.	59
Figura 23. El máximo consumo previsto de amonio y fosfatos ($mg\ L^{-1}$) y el valor optimizado de las variables importantes: NH_4^+ ($mg\ L^{-1}$), PO_4^{3-} ($mg\ L^{-1}$) and iluminación (luxes).	60
Figura 24. Composición de ácidos grasos de <i>Chlorella</i> sp y <i>Leptolyngbya</i> sp. A=SFA (Ácidos grasos saturados), B= PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados) y C= MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados).	60

Capítulo 1 Introducción

1.1. Antecedentes

De acuerdo con un informe realizado por el instituto del Petróleo Francés [1], después de la Segunda Guerra Mundial, se iniciaron investigaciones en Estados Unidos, Alemania, Japón e Inglaterra sobre técnicas de cultivo y sistemas de ingeniería para el cultivo de microalgas a mayores escalas. Dado que la necesidad de combustible alternativo de transporte había disminuido, la investigación en ese momento se centró en el cultivo de algas como una fuente de alimento o, en algunos casos, para el tratamiento de aguas residuales. El interés en la aplicación de algas para biocombustibles se reavivó durante el embargo petrolero y las subidas de los precios del petróleo de 1970, lo que llevó a iniciar el Programa de Especies Acuáticas en 1978. Dicho programa gastó \$25 millones en 18 años con el objetivo de desarrollar combustibles líquidos de transporte a partir de algas que serían competitivos con los precios de los combustibles derivados del petróleo. La investigación del programa se centró en el cultivo de microalgas en estanques abiertos, los cuales son sistemas de bajo costo, pero vulnerables a perturbaciones ambientales como cambios de temperatura o invasiones biológicas. Entre los hallazgos más significativos del programa se encontraba que el crecimiento rápido y la alta producción de lípidos eran "mutuamente excluyentes", ya que los primeros requerían altos nutrientes y los últimos bajos. El informe final sugirió que la ingeniería genética puede ser necesaria para poder superar esta y otras limitaciones naturales de las cepas de algas, y que las especies ideales podrían variar con el lugar y la estación. Aunque se demostró con éxito que la producción a gran escala de algas para combustible en los estanques al aire libre era factible, el programa no lo hizo a un costo competitivo con el petróleo, especialmente a medida que los precios del petróleo se hundían en 1990. Otras contribuciones a la investigación de los biocombustibles de algas han venido indirectamente de proyectos centrados en diferentes aplicaciones de cultivos de algas. Trabajos centrados en la recolección de gas hidrógeno, metano o etanol a partir de algas, así como suplementos nutricionales y compuestos farmacéuticos, han ayudado a informar la investigación sobre la producción de biocombustibles a partir de algas.

En las últimas décadas ha habido un aumento considerable en la demanda de energía en todo el mundo. Esto ha llevado a un rápido agotamiento de los combustibles fósiles y se espera que esta tendencia continúe [2]. Según International Energy Outlook [3], se prevé que el consumo mundial de energía aumente un 28 % en los años comprendidos entre 2015 y 2040, mientras que el consumo de combustibles fósiles derivados del petróleo aumentará de 190 a ~ 230 cuatrillones de unidades térmicas británicas. Además, el consumo de combustibles fósiles libera aproximadamente 29 gigatoneladas de CO₂ cada año a la atmósfera, lo que a su vez contribuye al calentamiento global [2].

Teniendo en cuenta el aumento de la demanda de combustibles fósiles a base de petróleo y su efecto sobre el medio ambiente y su escasez en un futuro próximo, las fuentes de energía alternativa parecen más atractivas y factibles en la práctica que nunca. Los biocombustibles de microalgas se han convertido en una fuente de energía renovable alternativa, ya que la célula de microalgas contiene lípidos (20-40%) que se pueden

utilizar para la producción de biodiésel. Además, la captura de CO₂ también es posible ya que las microalgas pueden fijar 1,83 kg de CO₂ mientras generan 1 kg de biomasa. Los biocombustibles a base de microalgas (biodiésel) no son tóxicos, son biodegradables, emiten un bajo contenido de azufre y liberan una gran cantidad de oxígeno (10–45%) en comparación con los combustibles a base de petróleo [2].

En México, se han realizado diversos estudios en el campo de los biocombustibles algales. En un estudio realizado en la Facultad de Química de la UNAM [4], las microalgas *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp. se cultivaron en entornos controlados que simulan las aguas residuales de maricultura. Las condiciones de crecimiento incluyeron inducir estrés con diferentes densidades de flujo de fotones (900, 1500 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y bajas concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo, para obligar a estas microalgas a aumentar su contenido de lípidos. Los mejores resultados se obtuvieron con *Tetraselmis* sp., que logró 132.8 mg L⁻¹ día⁻¹ de productividad de biomasa a 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, la mejor productividad de lípidos se alcanzó a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, también por *Tetraselmis* sp., con 29.5 mg L⁻¹ día⁻¹, donde la productividad de la biomasa era de 124.5 mg L⁻¹ día⁻¹. Las tres especies de microalgas pudieron eliminar > 90% de nitrógeno y ortofosfatos, y el 80% de carbono, lo que las hace adecuadas para tratar las aguas residuales de la maricultura, y, además, representa un alto contenido lipídico de biomasa que se puede usar como materia prima para la síntesis de biodiésel. Otra investigación realizada en Chiapas [5], demostró altas concentraciones de lípidos, en una microalga poco estudiada, *Verrucodesmus verrucosus*, cultivada en medios sintéticos y lixiviados de un biodigestor; esta microalga, presentó concentraciones altas de ácido palmítico, oleico, esteárico, palmitoleico y linoleico con una concentración de 34.9, 22.8, 9.3, 7.0 y 6.8% respectivamente, lo que indica la aptitud de esta especie para la producción de biodiésel. En otra investigación realizada por Rosales et al. [6], en las instalaciones del Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se analizó el efecto que tiene el fotoperiodo y la privación de nutrientes en la producción de lípidos, clorofila y proteína en la microalga *Chlorella vulgaris*. El tratamiento con un fotoperiodo 12:12 con 100% de nitrógeno obtuvo la mayor concentración de lípidos con una producción de 66.39%, así mismo se obtuvo la mayor producción de proteína en el fotoperiodo 12:12 con 50% de nitrógeno con 75.70%. La mayor concentración de clorofila a y b que se obtuvo fue de 14.61 mg mL⁻¹ y 7.63 mg mL⁻¹ en los fotoperíodos 18:6 con 200% de nitrógeno y 16:6 con 100% nitrógeno respectivamente, resultados que pueden ser utilizados en la obtención de productos de alto valor como el biodiésel.

Por otro lado, las microalgas se han estudiado para el tratamiento de aguas residuales (industriales y domésticas), incluidas las aguas residuales de cervecerías, los flujos de desechos farmacéuticos, la industria de los mataderos y efluentes de las plantas de aceite de palma. Aunque la fitorremediación basada en microalgas tiene numerosos beneficios, existen varios desafíos en los tratamientos de agua residual convencionales que también deben abordarse, ya que, no existe un método independiente que pueda aplicarse a una variedad de efluentes debido a las limitaciones asociadas con cada método; en general, los métodos de tratamiento convencionales tienen deficiencias, como el requisito de grandes terrenos, un aporte intensivo de energía y costos operativos y de mantenimiento elevados, por lo que se requiere desarrollar tecnologías alternativas para reciclar las aguas residuales junto con la fijación de carbono atmosférico; la biorremediación basada

en microalgas es la alternativa más segura, prometedora y eficiente que reemplaza a los métodos de tratamiento convencionales debido a su gran disponibilidad, mayor capacidad de consumo de nutrientes y diversas aplicaciones de la biomasa de algas producida [7].

Entre los retos del cultivo de microalgas en aguas residuales, se encuentran las composiciones bajas en nutrientes y las cargas orgánicas variables de las aguas residuales municipales, ya que estos factores pueden ser limitantes para el cultivo de microalgas. Las concentraciones más altas de sólidos suspendidos totales en las aguas residuales sin tratar también pueden tener un impacto negativo en el crecimiento de microalgas en condiciones fototróficas, ya que pueden influir en la dispersión y la penetración de la luz. Los niveles crecientes de metales pesados y otros contaminantes orgánicos emergentes en las aguas residuales municipales o urbanas representan un área que aún necesita ser explorada en detalle. Algunos metales presentes en este tipo de medios son micronutrientes que son necesarios para el crecimiento de microalgas mientras que otros no son esenciales y pueden ser tóxicos cuando están presentes en concentraciones altas. Sin embargo, la sensibilidad de las microalgas a los metales pesados y la inhibición de los metales pesados depende en gran medida de las especies y los compuestos [8]. Las nuevas investigaciones en este campo tratan de brindar una solución a algunos de los desafíos mencionados anteriormente.

En una investigación realizada en 2020 [9], se cultivaron dos microalgas *Spirulina platensis* y *Scenedesmus obliquus*, pertenecientes a cianobacterias y algas verdes, respectivamente, bajo regímenes de luz optimizados para investigar el rendimiento de biomasa, los componentes bioquímicos (proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofila), la eliminación de nutrientes y la recuperación de aguas residuales domésticas. Los resultados mostraron que con base en la metodología de superficie de respuesta (MSR), la microalga prefirió mayor intensidad de luz y tiempo de iluminación diario que la cianobacteria y los modelos podrían predecir bien los dos rendimientos de biomasa de microalgas respectivamente. Bajo los regímenes de luz optimizados, la microalga mostró un mejor crecimiento en aguas residuales domésticas con mayor contenido de clorofila y lípidos que la cianobacteria. Las dos microalgas mostraron una eliminación eficiente de nutrientes de las aguas residuales domésticas, pero la microalga *Scenedesmus obliquus* tuvo mayores eficiencias de recuperación de nutrientes que *Spirulina platensis* a pesar de una eliminación de Nitrógeno Total relativamente más baja. Este estudio proporciona suficiente información para la aplicación de las dos microalgas en el tratamiento de aguas residuales domésticas con producción simultánea de biomasa y recuperación de nutrientes.

En otro trabajo realizado en Japón en 2019 [10], seleccionaron microalgas de colecciones de cultivo o se aislaron de aguas residuales para la producción de compuestos químicos valiosos. La prueba de detección inicial con microalgas reveló que varias microalgas eucariotas y procariotas mostraron un crecimiento constante en las muestras de aguas residuales municipales. Entre ellas, *Tetraselmis* sp. y *Parachlorella kessleri* de colecciones de cultivo, y *Chloroidium saccharophilum* de la muestra de aguas residuales exhibieron una alta productividad de biomasa. Además, *P. kessleri* y *C. saccharophilum* mostraron una alta productividad de lípidos ($56 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, $35 \pm 10 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$,

respectivamente). Durante este cultivo, el 99% del nitrógeno y el 82% de los compuestos de fósforo fueron eliminados de la muestra de agua residual por la cepa *P. kessleri*. El análisis de las composiciones de ácidos grasos de *P. kessleri* y *C. saccharophilum* reveló que los lípidos derivados de estas microalgas eran adecuados para la aplicación de combustibles biodiésel, lo que indica que estas microalgas eran prometedoras para el tratamiento de aguas residuales y la producción de lípidos.

Finalmente, en un estudio [11], se demuestra los rendimientos de biomasa y lípidos de *Scenedesmus* sp. y la remediación simultánea de nutrientes de efluentes lácteos simulados (SDE). El método de Plackett Burman se emplea para seleccionar los nutrientes esenciales que afectan la producción de lípidos de *Scenedesmus* sp cultivada en SDE. El diseño compuesto central (DCC) se emplea para evaluar el efecto interactivo y la optimización de la variable. Se observa que las variables significativas son NaNO_3 , EDTA, micronutrientes y pH inicial y estas variables se analizan sobre la base de altos niveles de confianza ($p < 0,05$). El valor óptimo de pH inicial, NaNO_3 (g L^{-1}), EDTA (mg L^{-1}) y micronutrientes (ml L^{-1}) resultó ser 7.18, 1.21, 0.848 y 0.969, respectivamente, para la máxima acumulación de lípidos. El rendimiento de biomasa y la tasa de secuestro de nutrientes también se mejoran mediante la adición de nutrientes al nivel óptimo. El rendimiento máximo de biomasa y lípidos de *Scenedesmus* sp. en el medio optimizado fue de 2.68 g L^{-1} y 1.05 g L^{-1} , respectivamente, lo que resultó en un aumento general de 2.19 y 2.8 veces en comparación con SDE sin nutrientes agregados. La demanda química de oxígeno (DQO), la eficiencia de eliminación de nitratos y fosfatos también aumentaron en un 10.68 %, 17.59 % y 19.36 %, respectivamente, en SDE optimizado. Los ácidos grasos C16:0, C18:0, C18:1 y C18:3 fueron los ácidos grasos dominantes en los lípidos, lo que indica un gran potencial de producción de biodiésel de *Scenedesmus* sp. y un proceso simultáneo de secuestro de nutrientes utilizando nutrientes agregados a SDE.

El desarrollo de procesos combinados, así como la selección de condiciones de cultivo adecuadas para el reciclaje eficiente de nutrientes utilizando microalgas puede ofrecer una respuesta realista tanto para la gestión del medio ambiente como para la generación de energía.

1.2. Planteamiento del problema

El uso excesivo de los combustibles fósiles ha traído consigo efectos ambientales adversos, entre los que se encuentran, un incremento en la producción de gases de efecto invernadero (GEI), mismos que derivan en otras problemáticas como son el calentamiento global y el cambio climático, los cuales ya están teniendo impactos negativos sobre la biosfera [12,13]. Aunado a esta problemática, el aumento de la población, así como el aumento en la demanda de energía y alimento en el mundo y el agotamiento de los combustibles fósiles, trajo consigo una inminente necesidad de encontrar fuentes sustentables y renovables de energía, tal es el caso del biodiésel [14] [15]. En México, la combustión de este tipo de energéticos es responsable de poco más del 61% de las emisiones de CO₂ y del 46% de los GEI [16]. El objetivo del Programa Especial para el Aprovechamiento de Energías Renovables, en este mismo país, es fomentar fuentes energéticas renovables y la producción de biocombustibles con un enfoque técnico, económico, ambiental y socialmente viable. El programa plantea aumentar el porcentaje de la capacidad instalada en el país de estas alternativas de energía limpia en 29 % de la capacidad de generación prevista para el 2027 (26.49%) [17].

En el último siglo, ha habido un aumento en la contaminación del agua, debido al aumento de las actividades industriales y la urbanización; cerca del 71% de la superficie terrestre está cubierta por agua, misma que está siendo contaminada por las actividades del hombre. Esto trae como consecuencia un consumo inseguro para humanos y animales, debido a los compuestos tóxicos o dañinos que están contenidos en el agua, además de provocar problemas de salud, las cuales son responsables del 80% de las enfermedades y muertes en países en desarrollo [14]. Por lo que es de suma importancia el tratamiento adecuado del agua y su correcto aprovechamiento. El cultivo de microalgas acoplado con el tratamiento de aguas residuales se considera un método factible, ya que, entre otros beneficios, es posible reducir los costos de la producción comercial sustentable de biocombustibles algales [14,18].

El cultivo de microalgas a nivel industrial está aún en proceso de desarrollo, así como la optimización del diseño, operación y control del proceso de fotoproducción. Además, las condiciones de cultivo difieren a nivel industrial de las óptimas encontradas a escala laboratorio, por lo que existen pérdidas de productividad significativas [19]. Por lo tanto, es de suma importancia, realizar pruebas a escala piloto, variando y optimizando parámetros importantes con el fin de encontrar las condiciones de cultivo adecuadas para la cepa utilizada. El uso de microalgas aisladas de la región, las cuales están adaptadas a las condiciones del lugar puede ser positivo para lograr un cultivo en masa de microalgas, adecuado y eficiente.

De este modo, en este proyecto esta problemática es abordada con las microalgas aisladas de una planta de tratamiento de Tuxtla Gutiérrez, con el objetivo de conocer las condiciones que maximizan la biorremediación del agua residual y su influencia sobre la producción de biomasa y lípidos, estos últimos para su uso como biocombustible.

1.3. Justificación

Las microalgas, se consideran biocombustibles de tercera generación, por su rápida tasa de crecimiento, su habilidad para fijar gases de efecto invernadero, su alta productividad de lípidos, la dependencia de un cultivo en medio acuático para su producción, así como su idoneidad para la biodiversidad y el ambiente [20-23]. Presentan ventajas en comparación con los cultivos convencionales, tales como su alto potencial de rendimiento de biomasa y lípidos (Fig. 1), utilización de terrenos no cultivables para su cultivo, consumo de CO₂ y su crecimiento en medios alternativos, como el agua residual, agua de mar y efluentes [24,19,18]. Además, se pueden producir durante todo el año y tienen un contenido de aceite promedio de 20-50% con base en peso seco de la biomasa, por lo que el rendimiento de aceite es mayor que cualquier otro cultivo [24,19].

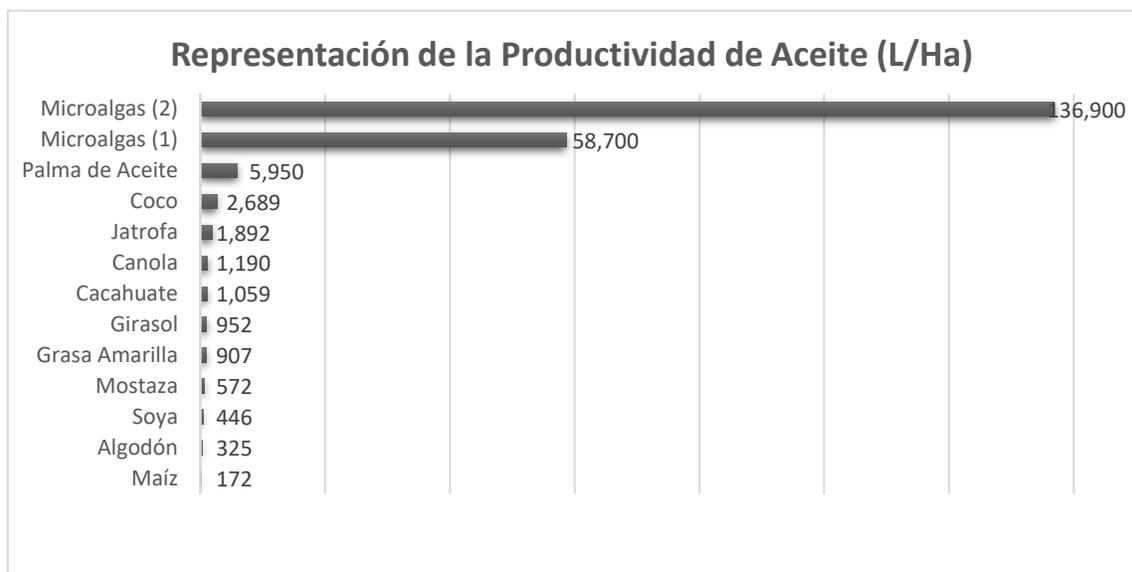


Figura 1. Productividad de aceite de las microalgas en comparación con los cultivos convencionales [16].
(1) 30% de aceite en biomasa (con base en peso seco);
(2) 70% de aceite en biomasa (con base en peso seco)

El cultivo de microalgas acoplado con el tratamiento de aguas residuales se considera un método factible, puesto que, además de remediar un medio contaminado, el cual es responsables del 80% de las enfermedades y muertes en países en desarrollo, es posible reducir los costos de la producción comercial sustentable de biocombustibles algales [14,18]. Las microalgas cultivadas en agua residual son capaces de consumir los nutrientes presentes en el medio, con remociones de nitrógeno y fósforo que van del 60 al 100%, generando altas productividades de biomasa y compuestos útiles, como son ácidos grasos, carbohidratos y pigmentos [9]. Por otro lado, el uso del agua residual artificial provee de ciertas ventajas en comparación con el agua residual real, como la facilidad de su uso en experimentos iniciales de laboratorio, además, no se consideran variables desconocidas como los componentes bióticos y carecen de material orgánico sólido y otras toxinas potenciales [25].

Varias cepas de microalgas se están caracterizando con el fin de identificar una cepa productora potencial con capacidades para resistir las condiciones ambientales fluctuantes y para acumular cantidades significativas de productos biológicos potenciales. Las cepas indígenas pueden tener este extraordinario potencial dentro de las regiones donde han sido aisladas. El ajuste del entorno nutricional y el mantenimiento de las condiciones ambientales adecuadas pueden generar altas productividades de lípidos y biomasa. Por lo tanto, la selección meticulosa de la cepa de microalgas en función de su tasa de crecimiento específica, contenido de lípidos, tipo de ácidos grasos y otras características bioquímicas esenciales sigue siendo un requisito previo para el desarrollo de procesos a escala comercial [26].

En esta investigación cabe destacar la importancia del uso de la microalga *Chlorella* sp. y la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. Estas microalgas, al haber sido aisladas del agua residual, ya se encontraban adaptadas al medio de cultivo utilizado en esta investigación. Además, *Chlorella* sp. es un género que ha sido muy estudiado para diversas aplicaciones [27], mientras que, la cianobacteria *Leptolyngbya* sp., se considera un alga con alta resistencia a condiciones adversas, debido a que es termofílica y a que fue extraída de un medio con altas concentraciones de compuestos tóxicos y biológicos. Esta última, ha sido aislada y probada en diversas investigaciones [28-31], sin embargo, en Chiapas no hay ningún reporte de su aislamiento, así como de su cultivo para la producción de biocombustibles.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Optimizar la concentración de amonio, fosfatos y luminosidad para el cultivo comparativo de la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. y la microalga *Chlorella* sp. en aguas residuales sintéticas, para conocer el consumo de estos nutrientes y su influencia en las productividades de biomasa y lípidos.

1.4.2. Objetivos específicos

- 1.- Cultivar las especies de microalgas en el agua residual sintética.
- 2.- Realizar cinéticas de crecimiento con el fin de evaluar la concentración de biomasa, asimilación de nutrientes, clorofila y lípidos.
- 3.- Realizar el análisis cromatográfico de los lípidos extraídos, con el fin de conocer el perfil de ácidos grasos.
- 4.- Estimar el potencial de producción de biodiésel de los lípidos de *Leptolyngbya* sp. y *Chlorella* sp.

1.5. Hipótesis

Las cepas algales *Chlorella* sp., *Leptolyngbya* sp. serán capaces de crecer en los medios y métodos de cultivo seleccionados, asimilando NH_4^+ y PO_4^{3-} y de esta manera generar altas concentraciones de lípidos con potencial para producir biodiésel.

Capítulo 2. Fundamentos Teórico

2.1. Microalgas

Las microalgas son organismos microscópicos, presentes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, existe una enorme variedad de especies, las cuales pueden vivir en un amplio rango de ambientes [32]. Éstas, pueden ser eucariotas o procariotas, unicelulares o multicelulares; las algas eucariotas, incluyen a las diatomeas o algas verdes, mientras que las procariotas consisten en cianobacterias (algas verde-azules) [33]. Necesitan principalmente tres componentes para su crecimiento, la luz del sol, el agua y una fuente de carbono. Obtienen sus nutrientes de los hábitats acuáticos, absorben la luz solar, capturan el CO₂ del aire y producen cerca del 50% del oxígeno atmosférico [34].

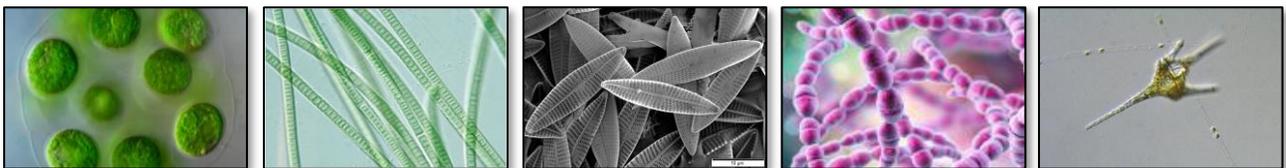
2.1.1. Clasificación

Generalmente las algas se clasifican de acuerdo con su color (Fig. 2). Los sistemas actuales de clasificación de algas se basan en los siguientes criterios principales [35]:

- a) Tipos de pigmentos.
- b) Naturaleza química de los productos de almacenamiento.
- c) Constituyentes de la pared celular.

Criterios adicionales toman en consideración los siguientes caracteres citológicos y morfológicos [35]:

- a) Aparición de células flageladas.
- b) Estructura de los flagelos.
- c) Esquema y vía de división nuclear y celular.
- d) Presencia de una envoltura de retículo endoplásmico alrededor del cloroplasto.
- e) Posible conexión entre el retículo endoplásmico y la membrana nuclear.



a) b) c) d) e)

Figura 2. Microalgas agrupadas de acuerdo con su clasificación.

a) Clorofitas, b) Cianobacterias, c) Bacilarofita, d) Rodofita, e) Dinofita.

Existe una enorme diversidad de las microalgas y se pueden ilustrar varios aspectos de esta diversidad en forma, ciclos de vida, fisiología, ecología y aplicaciones. Varias especies y/o géneros de microalgas han sido ampliamente estudiados y su clasificación se enlista en la Tabla 1 [36].

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies y/o géneros de microalgas.

Cianobacterias	Son organismos procariotas gramnegativos, oxigénicos, fotosintéticos, autótrofos y como grupo son muy prósperos y se encuentran en la mayoría de los hábitats de la Tierra, desde acuáticos hasta terrestres, así como en hábitats extremos como aguas termales, lagos salados, desiertos y regiones polares [36]. Contienen clorofila a, el nombre tradicional de algas verde-azules es debido a la presencia de ficocianina y ficoeritrina, que suelen enmascarar la pigmentación de clorofila [35]. A pesar de su estructura celular relativamente simple, son morfológicamente diversos, incluyendo formas unicelulares, coloniales, filamentosas y filamentosas ramificadas, a veces formando agregados fácilmente visibles a simple vista. Son importantes no solo como organismos fotosintéticos, sino también porque algunas especies fijan N ₂ , lo que las convierte en la fuente principal del nitrógeno combinado requerido por otros organismos [36].
Clorofitas	Las clorofitas, o algas verdes, abarcan un gran grupo de organismos con una gran variabilidad morfológica, que van desde formas microscópicas a macroscópicas [35]. Pueden ser encontrados en agua dulce, marina, o incluso en ambientes terrestres e incluyen miembros unicelulares y multicelulares [37]. Poseen clorofilas a y b y la mayoría no tienen pigmentos captadores de luz accesorios. Generalmente almacenan almidón [38]. El grupo incluye flagelados cocoides, unicelulares o coloniales, filamentos multicelulares o multinucleados [35].
Rodofita	La clase Rhodophyceae, o algas rojas, incluye principalmente especies marinas multicelulares y filamentosas, mientras que las especies unicelulares o de agua dulce están menos representadas [35,37]. Estas algas tienen clorofila a y d, ficobiliproteínas (ficoeritrina y ficocianina) y almidón florideano como productos de almacenamiento acumulados en el citoplasma fuera del cloroplasto, además, carece de células flageladas [35].
Euglenofita	Estos flagelados verdes son en su mayoría especies de agua dulce que se encuentran en charcos, ciénagas, estanques, lagos y ríos; a menudo son abundantes en aguas con alto contenido de amoníaco o urea [38]. Aunque la mayoría tiene cloroplastos, también hay muchas especies incoloras. Son flagelados grandes, fusiformes, alargados, esféricos u ovoides y pueden ser fotoautótrofos, mixotróficos o heterótrofos [36]. Tienen un plástido "verde" endosimbiótico secundario y utilizan las clorofilas a y b; sin embargo, su producto de almacenamiento es un glucano unido a β -1,3, paramylon [38].
Haptofita	Esta clase de microalgas son principalmente marinas y unicelulares o coloniales, aunque también son conocidas algunas especies de agua dulce. Son usadas como alimento en acuicultura [37]. Los haptofitos se caracterizan por tener no solo flagelos, sino también un orgánulo similar a flagelos, el haptoneuma, que tiene un papel en la captura y transporte de alimentos a la célula para su fagocitosis. También se caracterizan por tener escamas corporales orgánicas [38,36].
Dinoflagelados	Contienen miembros que son unicelulares y principalmente marinos, con algunas especies de agua dulce. Solo aproximadamente la mitad de los Dinophyta son fotosintéticos, mientras que el otro 50% son heterótrofos sin cloroplastos [37]. Estas algas son predominantemente organismos nadadores, por lo general, un flagelo rodea la célula en un cíngulo mientras que el segundo flagelo se extiende a lo largo de un surco más allá de la parte posterior de la célula y la empuja. Las células fotosintéticas suelen utilizar clorofila c2 y c3, así como peridininina, aunque los dinoflagelados con endosimbiontes tienen otros pigmentos [38,36].
Bacilarofita	También conocidas como diatomeas, incluye un número muy conspicuo de organismos unicelulares de color marrón dorado [35]. Están bien representados en el fitoplancton marino; sin embargo, la gran mayoría de las 100.000 especies estimadas son bénticas, viven adheridas a las superficies o se deslizan sobre los sedimentos utilizando un orgánulo único, el sistema del rafe [36]. Las diatomeas viven principalmente solas o unidas entre sí en cadenas de células o en agregaciones coloniales, en hábitats acuáticos y terrestres. Su color se debe al enmascaramiento del color verde de las clorofilas a, c1 y c2 por la pigmentación

	marrón y amarilla de la fucoxantina y el b-caroteno. El producto de almacenamiento es crisolaminarina (glucano ligado a b-1,3). Los lípidos también están presentes. el citoplasma está encerrado en una pared celular silíceica [35].
Crisofita	También conocidas como algas doradas, se pueden encontrar principalmente en aguas dulces, especialmente en aguas oligotróficas bajas en calcio. Tienen varias características inusuales. Por ejemplo, el nucleomorfo es un núcleo reducido que queda de una endosimbiosis secundaria, uno o ambos flagelos tienen pelos tubulares bipartitos y la célula está cubierta con un periplasto que consiste en placas especiales. Utilizan clorofilas a y c1 y ficobilinas para recolectar la luz utilizada en la fotosíntesis, así como fucoxantina y b-caroteno, que son los responsables del color marrón dorado; el producto de almacenamiento fotosintético es el almidón [38,35].
Feofita	La clase de Phaeophyceae, o algas pardas, incluye unas pocas formas filamentosas microscópicas y muchas formas gigantes, en su mayoría algas marinas. El color resulta del predominio de la fucoxantina sobre las clorofilas a, c1 y c2. El principal producto de almacenamiento es la laminarina (glucano ligado a b-1,3). Se encuentran casi exclusivamente en el hábitat marino, donde forman ricos bosques submarinos. La pared celular se compone de una microfibrilar de celulosa interna y una capa viscosa amorfa externa compuesta por alginatos. Los usos comerciales de las algas pardas se relacionan principalmente con la industria de los alginatos [35].

2.2. Fotosíntesis

La fotosíntesis (Fig. 3), representa el principal proceso utilizado para el crecimiento de las microalgas, cerca de la mitad de la fotosíntesis que ocurre en la Tierra está asociada con el fitoplancton marino. La producción de microalgas fotosintéticas está, por lo tanto, fuertemente ligada a la disponibilidad de la luz y la cantidad de luz absorbida por un alga suspendida en un fotobiorreactor depende de muchos factores, incluidos la posición específica de la célula en una instancia dada, la densidad del cultivo y la pigmentación de las células [39]. La fotosíntesis representa un proceso único de conversión de energía solar, en el cual, los compuestos inorgánicos y la energía de la luz son convertidos en materia orgánica por los organismos fotoautótrofos [40].

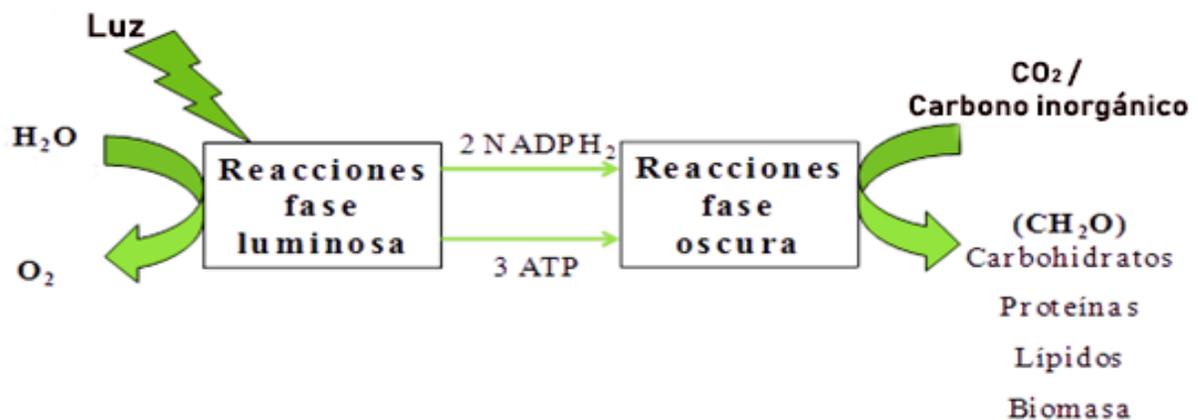


Figura 3. Reacciones de luz y de oscuridad en el proceso de la fotosíntesis.

El rendimiento de crecimiento y producción de un organismo fotosintético está obviamente relacionado con la disponibilidad de la luz [39]. Las microalgas pueden utilizar solo la energía disponible en el rango de longitud de onda de 400-700 nm, representado por la radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés), 45% de la energía de la superficie de la tierra es PAR [41]. La fotosíntesis oxigénica puede ser expresada como una reacción redox, manejada por la energía de la luz (captada por las moléculas de clorofila), en la cual el dióxido de carbono y agua son convertidas a carbohidrato y oxígeno. Dicha conversión es dividida tradicionalmente en dos etapas, las llamadas reacciones de luz y reacciones de oscuridad [40]. En las reacciones de luz, las cuales están enlazadas a las membranas fotosintéticas, la energía de la luz es convertida a energía química proporcionando un reductor bioquímico NADPH_2 y un compuesto de alta energía, el ATP. En las reacciones de oscuridad, la cual se lleva a cabo en el estroma, NADPH_2 y el ATP son utilizados en la reducción bioquímica secuencial del dióxido de carbono a carbohidratos [40].

2.2.1. Fotoinhibición

La energía de la luz está representada en términos de densidad de flujo fotónico (PFD por sus siglas en inglés) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Mayor PFD resultará en daño fotónico y por lo tanto reduce la capacidad fotosintética. Por lo que, la fotoaclimatación es esencial, a menos que las células mueran en poco tiempo con la exposición a un gran aumento repentino de luz [41]. Los procesos fotoadaptativos pueden modificar drásticamente la relación crecimiento-irradiación. Un ejemplo de una respuesta fotoadaptativa es el aumento comúnmente observado en la concentración de los pigmentos que absorben la luz en las células expuestas a una irradiación de baja intensidad. Otro fenómeno importante que generalmente se pasa por alto en los modelos de la relación fotosíntesis-irradiación es la fotoinhibición, una disminución en la tasa de fotosíntesis que ocurre cuando el nivel de irradiación excede un cierto valor. La fotoinhibición está bien documentada y está asociada con una desactivación parcial de componentes clave del aparato fotosintético [39]. Se define como una depresión de la fotosíntesis inducida por la luz que se manifiesta como una disminución en el rendimiento cuántico máximo de la fotosíntesis, una disminución en la convexidad de la curva de respuesta fotosintética a la luz y, en el caso de una exposición prolongada a una luz excesiva, una disminución en la tasa de fotosíntesis saturada de luz [42]. Las diversas respuestas fisiológicas a diferentes intensidades de luz pueden ocurrir de forma interactiva [39]. De esta manera, la fotoinhibición depende de varios factores, como son los niveles de irradiación a los que se exponen las muestras y el período de incubación, la composición de las especies, el estado fisiológico de las células, el historial previo de luz, así como la temperatura y la concentración de CO_2 [43]. Por ejemplo, las células adaptadas a la irradiación de bajo nivel son propensas a una mayor fotoinhibición cuando se transfieren a una luz intensa [39]. La introducción de una zona oscura también reduce el efecto del daño fotónico al evitar la exposición prolongada a PFD altos y proporcionar un tiempo oscuro para que las microalgas reparen el daño fotoinducido [41].

2.3. Aplicaciones

Las microalgas se han explotado para varias aplicaciones, como la generación de bioenergía, pigmentos, compuestos bioactivos, nutrición humana, alimentación animal y acuícola y síntesis de diversos compuestos para la industria farmacéutica, nutracéutica y cosmética. La biomasa de microalgas se ha enfatizado principalmente para la producción de bioenergía, sin embargo, es un recurso sin explotar para varios compuestos bioactivos y orgánicos [8].

2.3.1. Energéticos

Los biocombustibles se producen a partir de aceites vegetales, aceites usados, grasas de cocina recicladas, grasas animales o lípidos de microalgas. Entre varios combustibles renovables, los biocombustibles de microalgas fotosintéticas han atraído un gran interés por parte de los investigadores en la última década. El uso exitoso de biocombustibles de microalgas en campos como el transporte y la generación de energía mejoraría la seguridad energética y ayudaría a disminuir las preocupaciones graves asociadas con la utilización de combustibles fósiles, es decir, la contaminación ambiental y el calentamiento global [8]. La biorrefinería es la producción de biocombustibles, así como de coproductos de alto valor a partir de biomasa de microalgas mediante la integración de tecnologías químicas y de bioprocesamiento que tienen un bajo impacto ambiental. La biorrefinería de microalgas es relativamente nueva en comparación con las tecnologías e industrias de cultivos energéticos y petróleo. Usando la técnica de biorrefinería, las microalgas se cultivan primero en instalaciones de cultivo de algas (tratamiento de aguas residuales y mitigación de CO₂), luego se extraen compuestos biorreactivos de las microalgas cosechadas, las microalgas cosechadas luego se procesan térmicamente mediante gasificación, licuefacción o pirólisis, los productos químicos de alto valor son extraídos de las siguientes fases sólida, líquida o de vapor [44]. Los lípidos de microalgas se consideran una de las materias primas más adecuadas para la producción de biodiésel. La principal desventaja en la producción de biodiésel de microalgas a escala industrial es su alto costo de producción. Se sabe que las microalgas acumulan una gran cantidad de lípidos cuando se someten a condiciones de estrés nutricional [8].

2.3.2. Salud humana y productos nutricionales

Las microalgas son una rica fuente de proteínas, pigmentos y ácidos grasos omega y, por lo tanto, encuentran su aplicación en la alimentación humana y animal. Para la nutrición humana, las tabletas, cápsulas, polvos y líquidos suplementados con microalgas están disponibles en el mercado [8]. Se considera que las microalgas tienen una calidad de proteína mayor que otras fuentes vegetales, por ejemplo, trigo, arroz y legumbres, pero más pobre que las fuentes animales, por ejemplo, leche y carne [44]. Las proteínas de las microalgas son ricas en aminoácidos esenciales, los cuales no pueden ser sintetizados por los humanos y animales y necesitan ser suplementados en la dieta y son llamados aminoácidos esenciales [45]. Las microalgas, además producen esteroides que se utilizan para curar enfermedades vasculares. De manera similar, muchos compuestos

antioxidantes son producidos por las microalgas, esos compuestos antioxidantes tienen la habilidad para proteger del estrés oxidativo [44]. De entre estos el β -caroteno y la astaxantina son de especial interés, esta última se utiliza como suplemento nutricional y agente anticancerígeno, y exhibe propiedades preventivas para la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos neurodegenerativos, y también estimula la inmunización [37]. Por otro lado, las microalgas son productores naturales de ácidos grasos Omega 3, como el ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexaenoico, los cuales se utilizan para el tratamiento de enfermedades del corazón, enfermedades inflamatorias, asma y artritis, además, estimulan el sistema inmunológico. Los ácidos grasos omega de las microalgas se utilizan como suplementos alimenticios para humanos y animales [37,44].

2.3.3. Ambientales

Fijación de CO₂

Normalmente se utilizan dos estrategias principales para la mitigación del CO₂: los enfoques basados en reacciones químicas y la mitigación biológica. Las microalgas son capaces de fijar el CO₂ fotosintéticamente, por lo que son consideradas un método biológico alternativo para disminuir las emisiones de CO₂ [44,46]. Las tecnologías basadas en microalgas ofrecen una herramienta clave para la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero de las centrales eléctricas alimentadas con carbón y otros procesos industriales que son intensivos en carbono [8]. Si se utilizan microalgas para la producción de biocombustibles, la generación de CO₂ de las centrales eléctricas podría equilibrarse con la fijación de CO₂ a través del proceso fotosintético, por lo que la liberación neta de CO₂ sería cero [44]. Un beneficio importante de los biocombustibles de microalgas con respecto a la calidad del aire es que la producción de biomasa de microalgas ayuda con la biofijación del CO₂ (1 kg de biomasa de microalgas seca utiliza alrededor de 1,83 kg de CO₂). Las microalgas han demostrado eficiencias de fijación de CO₂ de hasta un 53 % cuando capturan CO₂ de gases de combustión simulados. Las eficiencias fotosintéticas de las microalgas oscilan entre el 10 y el 20 %, frente al 1,2 % de la mayoría de las plantas terrestres. Por lo tanto, las rápidas tasas de crecimiento de las microalgas dan como resultado tasas de secuestro de carbono considerablemente más altas en comparación con las plantas terrestres. Además, las microalgas son capaces de absorber y utilizar CO₂ de carbonatos solubles, es decir, Na₂CO₃ y NaHCO₃ CO₂ y HCO₃. Para la captura y utilización de CO₂ de microalgas, se requiere la selección de especies de microalgas tolerantes al CO₂ de varios entornos y la caracterización de los factores ambientales que influyen en el crecimiento [8,44].

Tratamiento de Agua Residual

Las microalgas se pueden usar para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Son capaces de eliminar con éxito el nitrógeno y el fósforo de diferentes medios, por lo que pueden ser usadas en el tratamiento terciario de aguas residuales [47,44]. Además, el impacto ambiental y el costo de producción del cultivo de microalgas se reduce considerablemente cuando se usa el agua residual como medio de cultivo, ya que

disminuye el uso de agua dulce y no se requiere de la adición externa de nutrientes [47]. Además, las aguas residuales ricas en CO₂ proporcionan un medio de crecimiento propicio para las microalgas, porque el CO₂ equilibra la relación de Redfield (proporción molecular de carbono, nitrógeno y fósforo en la materia orgánica marina, C:N:P = 106:16:1) de las aguas residuales, lo que permite una mayor eficiencia de consumo de nutrientes, tasas de crecimiento más rápidas, menores costos de cosecha y mayor producción de lípidos [48]. Las microalgas también pueden resolver el problema de la eutrofización al eliminar el nitrógeno y el fósforo presente en las aguas residuales [44] [46]. El uso de aguas residuales ricas en nutrientes para el crecimiento de microalgas y el tratamiento de aguas residuales tiene un gran potencial, puesto que puede dar lugar a la eliminación de contaminantes orgánicos, productos químicos, metales pesados, patógenos, con mitigación simultánea de CO₂. De esta manera se generan aguas residuales tratadas y oxigenadas para ser descargadas a los cuerpos de agua receptores. La biomasa producida durante el tratamiento se puede utilizar en numerosas aplicaciones, como biocombustibles, alimento y productos de alto valor (por ejemplo, antioxidantes, pigmentos, ácidos grasos, polisacáridos, etc.) [8,44]. Sin embargo, existen preocupaciones sobre el uso de la biomasa producida con aguas residuales para aplicaciones alimenticias debido a la posible contaminación por metales pesados [8].

2.3.4. Otros usos

Las microalgas también tienen aplicaciones cosmetológicas, sus extractos son usados principalmente en productos de cuidados de la piel y la cara, también son usados en productos de cuidado del cabello y protección solar [44]. Las cianobacterias, son bien conocidas por sus aplicaciones como colorante en la cosmética, farmacéuticas, y en la industria alimenticia, gracias a su alto contenido de ficobiliproteínas. Las algas rojas, también se considera una fuente prometedora para la producción de ficobiliproteínas, que podría presentar cierto interés en la industria cosmética y farmacéutica como agente colorante [36].

2.4. Las especies

Chlorella (Fig. 4) es un grupo de microalgas verdes eucariotas, con una alta capacidad para la fotosíntesis, la cual es capaz de reproducirse en varias horas y requieren solo luz solar, dióxido de carbono, agua y una pequeña cantidad de nutrientes. En los últimos años, varios investigadores han demostrado diferentes aplicaciones para la microalga (clorofita) *Chlorella* en varias áreas industriales, como en alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, entre otros, que ya han extraído compuestos químicos de alto valor, como los carotenoides (astaxantina, luteína, β-caroteno, violaxantina y zeaxantina), antioxidantes, vitaminas, polisacáridos, proteínas, péptidos, ácidos grasos, entre otros [27].



Figura 4. Vista microscópica de la microalga *Chlorella* sp.

Leptolyngbya (Fig. 5), por otro lado, es uno de los géneros de cianobacterias más comunes. Esta investigación se considera el primer reporte de esta microalga en el estado de Chiapas. Sus filamentos se encuentran en racimos o en esteras y están enrollados irregularmente. Contienen numerosos morfotipos y ecotipos, que son muy comunes en suelos y en perifiton y metafiton y en una variedad de ambientes de agua dulce y salinos. Varias especies se conocen de aguas termales y minerales o crecen subaéreamente sobre rocas húmedas [49]. Son conocidas por acumular niveles significativos de lípidos neutrales en su biomasa con perfil de ácidos grasos de calidad [26].



Figura 5. Vista microscópica de la cianobacteria *Leptolyngbya* sp.

2.5. Microalgas y lípidos

2.5.1. Definición y funciones metabólicas

Los lípidos aseguran la supervivencia de las células de microalgas en los periodos nocturnos y con intensidades de luz variables y también suministran energía para los procesos biológicos asociados con la multiplicación de las células de microalgas, así como con la replicación del ADN, la división nuclear, citocinesis y formación y liberación de células hijas. La oxidación completa de los ácidos grasos puede generar energía a 9 kcal g^{-1} (38 kJ g^{-1}), en comparación con alrededor de 4 kcal g^{-1} (17 kJ g^{-1}) para los carbohidratos. Los lípidos incluyen dos tipos: lípidos neutros, que sirven como reservas

de energía y lípidos polares, que son constituyentes de orgánulos y membranas [50]. La diversidad de ácidos grasos y esteroides se encuentran en las membranas celulares entre los grupos de algas, estos lípidos son más difíciles de extraer que los lípidos acumulados como cuerpos lipídicos (lípidos neutros). De los lípidos de membrana, los galactolípidos son los principales constituyentes de las membranas tilacoides en las que reside la maquinaria fotosintética. Las algas oleaginosas son las mayores productoras de lípidos neutros, es decir los que se encuentran como productos de almacenamiento, mismos que con frecuencia se observan como gotitas de aceite en las células. Estos lípidos son en gran parte ácidos grasos poliinsaturados [38]. El metabolismo de los lípidos comienza con un grupo inicial idéntico de moléculas que contienen 3 carbonos, como el gliceraldehído 3- fosfato (GAP) y el 3-fosfoglicerato (3PG) [50].

2.5.2. Biosíntesis

El metabolismo lipídico de las algas se realiza en el cloroplasto mediante la síntesis *del novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y se considera el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de este acetil probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas. Las moléculas poliinsaturadas, producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación, son precedidas por los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 ω 9). Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado [51].

2.5.3. Factores que determinan su producción

Las microalgas, acumulan en su organismo, cantidades significativas de lípidos, por lo que se consideran adecuadas para la producción de biodiésel, debido a que su composición de ácidos grasos es similar a la de las plantas y a la grasa animal [24]. Bajo condiciones de cultivo adecuadas, algunas especies son capaces de acumular alrededor del 50 al 70% de lípidos por peso seco [52].

2.6. Lípidos y biodiésel

2.6.1. Biodiésel de microalgas

El biodiésel es un biocombustible que está constituido por ésteres de metilo de ácidos grasos de cadena larga derivado de diversos tipos de aceite de origen animal, vegetal e incluso de microalgas, el cual debe cumplir con ciertas especificaciones técnicas para ser usado en motores diésel [53]. Los lípidos que se usan para su producción son los

triacilglicéridos, en los que tres moléculas de ácidos grasos son esterificadas con una molécula de glicerol [54]. Comúnmente, la materia prima usada para los biocombustibles son cultivos convencionales, como la soya, la palma, el trigo, la cebada y el maíz, los cuales, en algunos casos, son utilizados para alimentación humana y requieren de tierras agrícolas para su producción [55,56]. La extracción del biodiésel se realiza a través de un proceso de transesterificación, en presencia de un catalizador [57].

Ventajas del biodiésel de microalgas

Las ventajas del uso de microalgas para la producción de biodiésel, sobre otros tipos de biomasa, son: pueden ser cultivadas usando CO₂, lo que ayuda a la mitigación de GEI [54,58]; el ciclo de cosecha de las microalgas es bastante corto y su tasa de crecimiento es alta [55], de 1-3 duplicaciones por día, lo cual es al menos de 5 a 10 veces mayor que la tasa de crecimiento de las plantas [58]; las algas son capaces de usar nutrientes libremente disponibles en aguas residuales, como nitrógeno y fósforo [58,59] lo que disminuye los costos de su producción [59]; tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional [14] y pueden ser cultivadas sobre tierras no productivas, como son los desiertos o las costas [58,54], y usando agua de mar, salobre o residual, con lo cual se disminuye la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimento [60,16].

Retos del biodiésel de microalgas

Los retos a los que se enfrenta este enfoque son: la selección de cepas con alto contenido lipídico, alta productividad, mejor perfil de lípidos y adaptabilidad al tipo de agua a usar y a las condiciones ambientales; el establecimiento de estrategias de cultivo adecuadas, que permitan lograr una alta productividad de lípidos y de biomasa; el uso de aguas residuales, evitando contaminaciones; la selección del tipo de reactor más adecuado, o una combinación de ellos, para lograr la máxima productividad de biomasa al mínimo costo y la disminución de los costos de cosecha, extracción de lípidos y conversión a biodiésel [61,16].

Por otro lado, a pesar de los beneficios asociados con la producción de biodiésel usando microalgas, existen algunas limitantes económicas en el desarrollo a gran escala, debido algunas barreras técnicas, como son, procesos complejos, así como, altos costos de producción y de entrada de energía [14].

2.7. Proceso de producción de microalgas

2.7.1. Selección de la especie

La selección de la cepa es probablemente lo más importante para la producción de microalgas, puesto que tienen características y comportamientos diferentes [62]. Las especies de microalgas varían considerablemente en la eficiencia de recuperación de nutrientes, la tolerancia a sustancias tóxicas en las aguas residuales, la adaptabilidad al cambio climático y la composición química [63]. Además, tienen diferentes preferencias en la forma de cultivo y en las propiedades del medio [62]. Por lo que para la exitosa

producción de biomasa debe considerarse la selección de especies que crecen rápidamente en las condiciones climáticas locales, la resistencia a la fotoinhibición, la tolerancia a altas concentraciones de oxígeno disuelto, a una amplia gama de condiciones de temperatura, a altas concentraciones de sal, al esfuerzo cortante, a un amplio rango de pH y alcalinidad, la eficiencia de utilización de nutrientes, la cosechabilidad y finalmente, la compatibilidad al agua residual a utilizar [63,64].

2.7.2. Cultivo de microalgas

Por otro lado, las condiciones ambientales óptimas de crecimiento microalgal (Fig. 6) son [65]: la luz, se considera uno de los más importantes factores limitantes, puesto que estas crecen de manera fotosintética (los sistemas algales pueden ser iluminados con luz artificial, solar o ambas); el CO₂, es la fuente usual de carbono para la fotosíntesis, considerado, además, un GEI; la temperatura, el rango óptimo se encuentra, entre los 20 y 24°C. sin embargo las cepas algales, son capaces de adaptarse y crecer en un amplio rango de temperatura que va de los 25 a los 50°C y el pH, para la mayoría de los cultivos, el rango de pH va de 7 a 9, con un óptimo de 8.2 a 8.7.

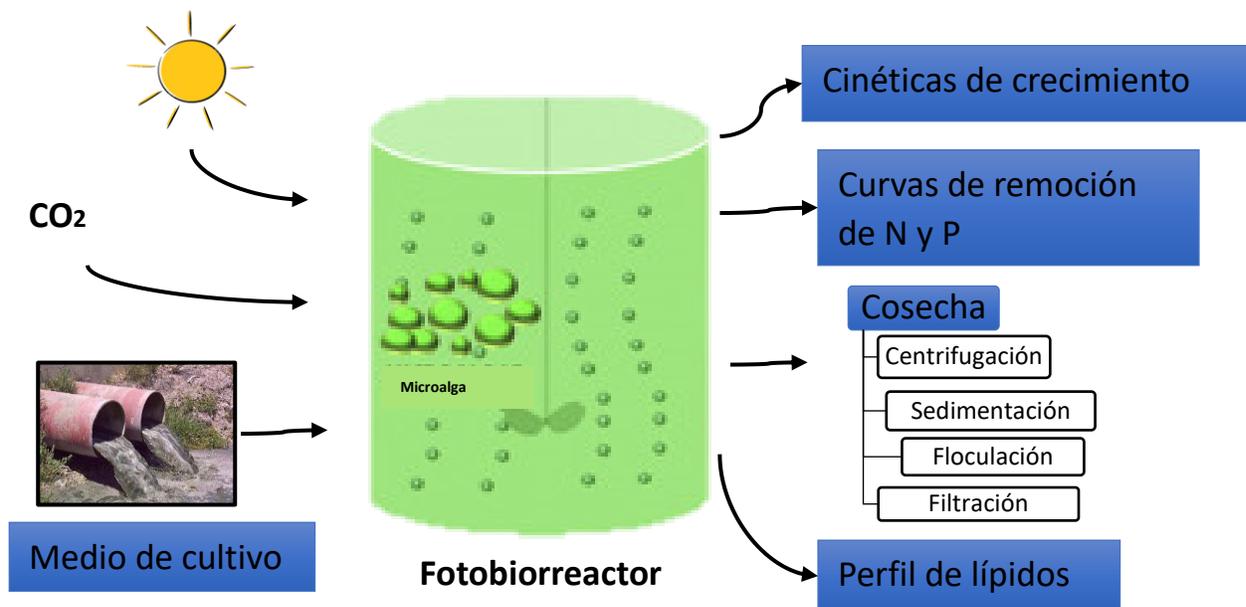


Figura 6. Esquema general del proceso de producción de microalgas.

2.7.3. Principales factores de crecimiento

Luz

Las microalgas son organismos fotosintéticos que convierten la energía de la luz, solar o de una fuente artificial, en energía química almacenada en diferentes compuestos orgánicos incluidos los carbohidratos, lípidos y proteínas. La intensidad de la luz y la longitud de onda son los factores más significativos que afectan el crecimiento y metabolismo microalgal [66]. El régimen de luz utilizado para su cultivo es también un factor muy importante [9]. La absorción de energía por parte de las microalgas depende

de la naturaleza química de los pigmentos fotosintéticos, que es la razón principal del impacto de las longitudes de onda de la luz aplicada [66]. La utilización de la energía luminosa con baja intensidad puede provocar un retraso en la tasa fotosintética en las microalgas, mientras que la alta iluminación puede causar fotohinibición al dañar los pigmentos fotosintéticos [67]. La cantidad de luz absorbida por una célula de alga suspendida en un fotobiorreactor depende de muchos factores, incluida la posición específica de la célula en un momento determinado, la densidad del cultivo y la pigmentación de las células [39]. En general, los pigmentos, los carbohidratos y las proteínas disminuyen a medida que la intensidad de la luz aumenta hasta el punto de saturación de la luz, mientras que la variación de los lípidos con la intensidad de la luz depende principalmente de las especies de microalgas y el nivel de nutrientes. Asimismo, las variaciones en el ciclo de luz:oscuridad imponen cambios en el contenido celular de proteínas, carbohidratos y lípidos [9].

Temperatura

La temperatura es un factor importante ya que altera los procesos bioquímicos en la síntesis celular de la microalga. La mayoría de las especies crecen mejor a temperaturas entre 20 y 30 °C, excepto las algas termófilas que toleran temperaturas de hasta 40 °C [68]. La optimización de la temperatura de crecimiento del cultivo es crucial para lograr la máxima tasa de crecimiento con una absorción significativa de nutrientes. En las microalgas, las bajas temperaturas conducen a una tasa de fijación de CO₂ reducida y, por lo tanto, a un transporte de electrones más lento. Además, las fluctuaciones de temperatura, por encima o por debajo del rango óptimo, conllevan problemas, como la inhibición del fotosistema II, alteraciones en los perfiles de ácidos grasos, principalmente la insaturación de ácidos grasos [67]. Algunos autores han llegado a la conclusión de que una temperatura más alta es responsable de la acumulación de lípidos saturados y una temperatura más baja de la acumulación de lípidos no saturados [69]. Esta tendencia a convertirse en formas insaturadas podría explicarse por el hecho de que este tipo de ácido graso ayuda a mantener la fluidez de la membrana celular cultivada a temperaturas más bajas. La inestabilidad en los perfiles de lípidos en una microalga debido a los cambios de temperatura podría afectar las propiedades del biodiésel de algas en su conjunto bajo diferentes condiciones climáticas y estaciones [67]. La mayoría de las algas de interés para la producción de lípidos tienen una tolerancia a la temperatura de entre 15 y 40 °C. Los investigadores han demostrado que muchas de las algas productoras de aceite las especies crecen mejor entre 25 y 30 °C. La temperatura óptima de crecimiento varía según la especie y la respuesta deseada de las algas [69].

pH

Otro factor importante que influye en el crecimiento de las microalgas es el pH, donde el pH óptimo oscila entre 6 y 9 para que crezcan la mayoría de las especies [68]. El pH mide el nivel de acidez o alcalinidad que tiene un cuerpo de agua. La variación del pH afecta el crecimiento de varias maneras. El pH aumenta durante el día debido a la asimilación fotosintética de CO₂ por las algas seguida de una disminución del pH en la noche debido al proceso respiratorio. Existe una relación entre la concentración de CO₂ y el pH del medio de cultivo de microalgas. Está relacionado con el equilibrio químico entre especies químicas como CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ y CO₃²⁻. El equilibrio de estas especies depende del

pH, cuando el CO_2 predomina a un pH inferior a 7,0 y el CO_3^{2-} predomina a un pH superior a 10. Se ha demostrado que las microalgas provocan un aumento del pH de 10 a 11 unidades debido a la absorción fotosintética de CO_2 para convertir su biomasa. El aumento de CO_2 puede conducir a una mayor acumulación de biomasa, pero conduce a un valor de pH más bajo, lo que tiene un efecto adverso en la fisiología de las microalgas. Sin embargo, cuando el pH aumenta demasiado, la fotosíntesis puede verse limitada debido a la escasez de CO_2 [69]. Por otro lado, la contaminación de las aguas residuales por otros microorganismos se puede controlar manipulando el pH del medio. La contaminación por bacterias se puede controlar aumentando el pH más allá del valor óptimo que se requiere para que crezcan las bacterias heterótrofas. El pH óptimo requerido para el crecimiento de bacterias aeróbicas, como se observó en un estanque de microalgas, fue de 8.3. De manera similar, para los medios a base de vinaza, se informó que la contaminación por hongos podría controlarse aumentando el pH del medio hasta 8. La susceptibilidad del cultivo de microalgas a los herbívoros se puede controlar aumentando la concentración de amoníaco libre en el medio mediante la manipulación del pH. También se puede lograr un aumento en el amoníaco libre aumentando el pH del sistema a través de la volatilización del amoníaco. Pero esto debe realizarse sin afectar el crecimiento de las microalgas [2].

Nutrientes

La baja concentración de algunos nutrientes puede causar una fase de retraso prolongada. Se debe proporcionar suficiente medio nutritivo para mantener la tasa máxima de crecimiento. El nivel suficiente de nutrientes en el medio de cultivo debe mantenerse suministrando una cantidad igual de nutrientes que consumen las algas cosechadas [41]. Para cultivar algas, los macronutrientes deben contener principalmente nitrógeno y fósforo (también se requiere silicio para las algas de agua salada). Además, también se necesitan metales traza, como Fe, Mg, Mn, B, Mo, K, Co y Zn. La fijación de CO_2 también es necesaria para construir un medio equilibrado para un crecimiento óptimo. La biomasa de microalgas generalmente consiste en alrededor de 40%-50% de carbono, 4%-8% de nitrógeno y 0,1% de fosfato en peso seco. En la naturaleza, algunos de estos se pueden encontrar fácilmente a partir de fuentes minerales y otros se pueden encontrar mediante el metabolismo bacteriano. El nitrógeno es abundante en la naturaleza porque las bacterias lo fijan continuamente, mientras que el fósforo es limitado, y se une efectivamente como ortofosfato en el sedimento. Los niveles de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo combinados, son muy importantes en la producción de lípidos. Muchos artículos han demostrado que un medio de crecimiento deficiente en nitrógeno provoca que las algas produzcan niveles más altos de lípidos. Las deficiencias de nutrientes y el exceso de nutrientes, ambos, pueden causar cambios fisiológicos y morfológicos en las microalgas, ya que pueden inhibir algunas de las vías metabólicas vitales [69].

Fuentes de Carbono

El carbono constituye aproximadamente el 50% de la biomasa de microalgas y es el macronutriente esencial más presente en todos los componentes celulares principales, como polisacáridos, aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos. Las microalgas pueden fijar

el carbono atmosférico a través de la fotosíntesis en modo fotoautotrófico. Esto requiere una estrategia eficaz de suministro de luz y un suministro de CO₂ gaseoso o soluble [70]. En el sistema de cultivo de microalgas en suspensión, el CO₂ podría ser proporcionado por aireación. El CO₂ primero se disuelve en los medios y se diluye mucho antes de la utilización de las microalgas [71].

2.7.4. Sistemas de Cultivos

El tipo y la configuración del biorreactor tienen un efecto significativo en el capital y costo de mantenimiento, la eficiencia de eliminación de nutrientes, el crecimiento de microalgas y la dificultad de recolección de biomasa [63].

En general, se podría diseñar un fotobiorreactor económicamente viable incorporando las siguientes características [41]:

- Proporcionando la mayor relación área superficial/volumen.
- Estabilización del CO₂ absorbido.
- Proporcionar tiempo suficiente para la absorción de fotones.
- Mantener una concentración óptima de microalgas que coincida con la tasa más alta.
- Mantener el nivel deseado de nutrientes.

Hasta la fecha, se han diseñado y probado diversos biorreactores para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa de algas. Los sistemas de biorreactores empleados en el proceso de acoplamiento se pueden clasificar generalmente como sistemas abiertos y cerrados controlados (Fig. 7) (por ejemplo, fotobiorreactores) [63].

Abiertos

El sistema de cultivo en estanque abierto generalmente consiste en un tanque de agua simple o estanques de tierra más grandes donde se agregan nutrientes de terceros. La luz natural juega un papel en la fotosíntesis y el CO₂ proviene de la atmósfera. El estanque generalmente está diseñado en una configuración de pista, en la que una rueda de paletas proporciona circulación y mezcla de las células de algas y nutrientes. Los caminos de rodadura generalmente están hechos de concreto vertido, o simplemente se excavan en la tierra y se revisten con un revestimiento de plástico para evitar que el suelo absorba el líquido. Los deflectores en el canal guían el flujo alrededor de las curvas que también minimizan el espacio y las pérdidas. El medio se agrega frente a la rueda de paletas y el caldo de algas se recolecta detrás de la rueda de paletas, después de que haya circulado por el circuito [69]. Los principales cuellos de botella con los sistemas abiertos son la falta de control de la temperatura y la vulnerabilidad de las microalgas a los parásitos de las algas y otras cepas de microalgas que pueden superar a las cepas más débiles [60]. Las altas posibilidades de contaminación con otros microorganismos y pérdida de agua por evaporación. La pérdida de agua en un estanque abierto puede cambiar la composición iónica del medio. El desequilibrio en la composición del medio

podría deteriorar el crecimiento de las microalgas y, en última instancia, conducir a una productividad de biomasa baja [2]. Los sistemas de cultivo abiertos se pueden dividir en:

Estanque sin remover. El sistema abierto más simple para el cultivo de microalgas son los estanques poco profundos sin agitación. Los estanques sin agitar se construyen en sistemas de agua natural con profundidades de medio metro para permeabilidad ligera con la ausencia de una unidad de agitación. Proporciona una forma económica y conveniente para el cultivo de microalgas. Suele instalarse en lagos o balsas lagunares que hacen crecer competitivamente las algas por la presencia de otros microorganismos como protozoos, bacterias y virus. La desventaja de este sistema es que la disolución del dióxido de carbono del aire en el agua limitará la tasa de crecimiento de las microalgas, lo que resultará en un bajo rendimiento de biomasa. Otro inconveniente de este sistema incluye la lenta difusión de nutrientes y la flotación de algas muertas y vivas, lo que restringirá la penetración de la luz solar para un crecimiento óptimo de las microalgas [60].

Estanque tipo pista de carreras: Este método de cultivo se ha utilizado ampliamente en cultivos de sistemas abiertos y también para la producción comercial de algas a gran escala. Los estanques tipo pista de carreras generalmente se construyen con 15 a 50 cm de profundidad que se construyen como un solo canal o grupos de canales. La mezcla en esta configuración es inducida por ruedas de paletas para asegurar que las células de algas estén suspendidas dentro del medio de cultivo. La mezcla producida por una sola rueda de paletas podría ser suficiente para cubrir una gran área de microalgas. La mezcla turbulenta creada puede ayudar a mantener una densidad uniforme de microalgas y los remolinos generados reducirán el tiempo de residencia de las algas en regiones oscuras. Por lo tanto, las células de algas tendrían una buena mezcla en todo el canal con un flujo continuo que les permita recibir suficiente la luz solar y el intercambio de CO₂ con la atmósfera [60].

Estanques circulares: Los estanques circulares se derivan de la innovación de los estanques de tratamiento de aguas residuales que consisten en un reactor circular con un brazo giratorio ubicado en el centro. Estos estanques suelen tener una profundidad de 20 a 30 cm y un diámetro de 40 a 50 cm. La mezcla en este diseño se realiza mediante un brazo giratorio que se mueve en dirección axial para mezclar los medios de cultivo y las células de algas. La mezcla de los medios en estanques circulares será más eficiente en comparación con los estanques sin agitación, pero el riesgo de contaminación aún está presente [60].

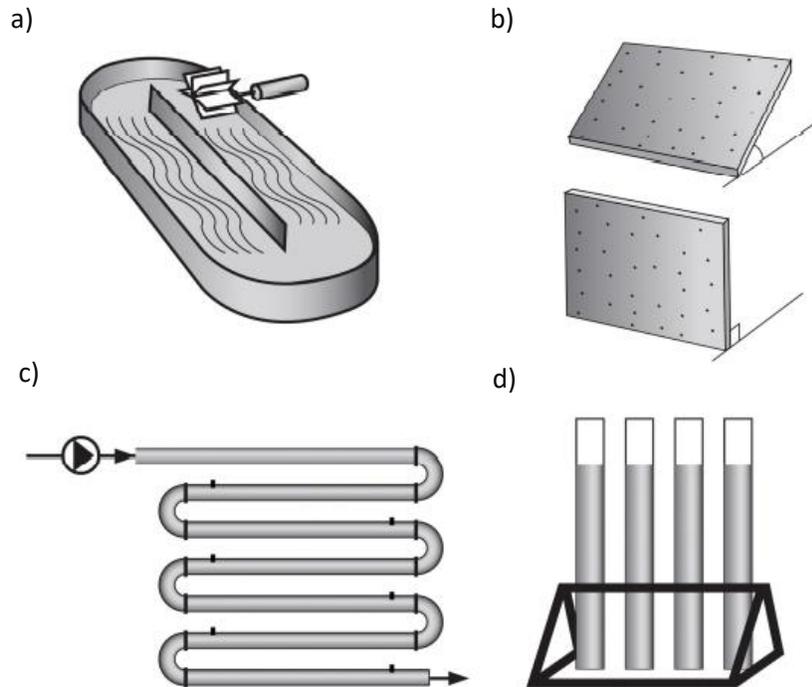


Figura 7. Variedad de sistemas de cultivo.

a) Sistemas abiertos, b) c) y d) sistemas cerrados. a) Cultivo tipo carrusel (High Rate Algal Ponds; HRAP), b) Fotobiorreactor en paneles, c) y d) Fotobiorreactores tubulares.

Cerrados

Un PBR es un recipiente cerrado (o en su mayoría cerrado) para la producción fototrófica donde la energía se suministra a través de luces eléctricas [8]. Los PBR se pueden ubicar en interiores o exteriores, según los sistemas de recolección y distribución de luz y su viabilidad comercial. En los PBR, el medio de cultivo está encerrado en una matriz transparente de tubos o placas, y el caldo de microalgas circula desde un depósito central [69]. Se han adoptado la utilización de PBR cerrados para el cultivo de microalgas para reducir el riesgo de contaminación. Aunque los costos operativos y de capital son altos para PBR cerrados, puede mantener el cultivo axénico de microalgas que puede mejorar el crecimiento de biomasa de microalgas y también la eliminación de nutrientes. El uso de PBR cerrados para el cultivo de microalgas es más versátil en comparación con el sistema abierto porque puede utilizar luz solar, luz artificial y una combinación de luces. Por lo tanto, el cambio en la intensidad de la luz debido a la variación de la luz solar puede gestionarse proporcionando luz artificial cuando sea necesario. Por lo tanto, el ciclo de luz-oscuridad de las microalgas se puede mantener en este sistema, lo que en última instancia puede aumentar el rendimiento total anual de lípidos en un 25-42 %. Generalmente no son útiles para tratar un alto volumen de aguas residuales, sin embargo, los sistemas cerrados pueden usarse para producir inóculo en el sitio de aguas residuales en un volumen relativamente bajo. Como las microalgas necesitan adaptarse a las aguas residuales dadas, los diversos sistemas PBR cerrados pueden usarse como un paso inicial para ese propósito [2]. Los PBR pueden ser de diferentes tipos, como bolsas de polietileno, cilindros de fibra de vidrio, fotobiorreactores modulares planos, tubulares

inclinados, placa de vidrio segmentada y fotobiorreactores anulares. El objetivo principal de cualquier PBR es la reducción de los costos de producción de biomasa. Para lograr el objetivo, se han realizado numerosos estudios sobre mejora de catalizadores, modelado del PBR, control de parámetros ambientales durante el cultivo y diseños asépticos. El control de parámetros operativos como el pH, la temperatura y la difusión de gases también es un tema vital en PBR [69]. Los fotobiorreactores se pueden clasificar en:

Fotobiorreactor de tubo vertical. En el diseño de fotobiorreactores de tubos verticales, hay dos tipos que son la columna de burbujas y la columna de elevación por aire. Las características similares de ambos tipos de fotobiorreactores son que tienen un rociador de aire adjunto en la parte inferior del reactor para mejorar la transferencia de masa al generar burbujas de aire para mezclar las algas con el medio de cultivo. El reactor de columna de burbujas se asemeja a un recipiente de forma cilíndrica sin estructura interna por lo que el patrón de flujo del fluido es impulsado principalmente por las burbujas de aire generadas. Este tipo de fotobiorreactor también tiene varias ventajas que incluyen una transferencia de masa satisfactoria y una alta relación área superficial/volumen. Normalmente, la altura del reactor es el doble de su diámetro y la fuente de luz se suministra externamente. El "efecto de destello de luz" mejora la mezcla y la eficiencia fotosintética de las células de algas al fomentar la movilidad de las células de algas desde áreas iluminadas hasta zonas oscuras axiales. Con esta configuración, es crucial controlar el caudal de gas, ya que afecta el ciclo de luz y oscuridad. El diseño mejorado de la columna de burbujas es el puente aéreo reactor, que es rentable para el cultivo de diversos tipos de microalgas. Cuenta con dos zonas de interconexión dentro de las cuales constituyen una zona ascendente y una zona descendente (irradiada). En esta configuración, el proceso se denomina "puente aéreo" debido a que las burbujas de aire conducen el líquido desde la zona ascendente dentro del tubo concéntrico a la zona iluminada exterior y esto lleva al líquido a circular entre las zonas oscuras y claras. También existen ventajas conocidas para este tipo de fotobiorreactor que incluyen una buena mezcla con bajo esfuerzo cortante, transferencia de masa eficiente y ser ideal para la inmovilización de algas. Los niveles de oxígeno de un sistema cerrado serán más bajos y rápidos de estabilizar en comparación con los de un sistema sin inyección de burbujas. Las burbujas aumentan el área superficial del agua a la fase gaseosa y ventilan efectivamente el oxígeno que producen las microalgas. Esto ayuda aún más con las tasas de crecimiento, ya que el aumento del contenido de oxígeno tiene un impacto negativo en el crecimiento. Una concentración demasiado alta de oxígeno en el medio de cultivo inhibirá la difusión lejos de los centros de reacción, lo que hará que la difusión de oxígeno sea la más adecuada. paso limitante del proceso. Los fotobiorreactores verticales tienden a tener una mayor producción de área de biomasa en comparación con los fotobiorreactores horizontales, ya que tienen densidades de flujo de fotones incidentes más bajas en la superficie del reactor. El fotobiorreactor vertical también tiene la eficiencia fotosintética promedio y la productividad volumétrica más altas, donde la intercepción de la luz se puede mejorar aún más para maximizar la productividad del área y la eficiencia fotosintética. Estas características prometedoras hacen que el fotobiorreactor vertical sea una buena opción para aplicaciones a gran escala, pero la compensación entre la eficiencia productiva y el alto costo de capital puede necesitar ser considerada antes de implementarla a escala industrial [60].

Fotobiorreactor de tubo horizontal: El tubo horizontal, también conocido como reactor tubular, es el primer modelo construido de reactor cerrado para el cultivo de microalgas. Está compuesto por largos tubos horizontales que se pueden colocar en muchas variaciones para formar paredes, hélices o paneles. Esta configuración requiere una gran área de terreno debido a la gran superficie requerida. Con esta configuración, el diámetro del tubo puede ser más pequeño debido a la larga y gran distancia de permeabilidad de la fuente de luz al líquido de cultivo. Este tipo de reactor sólo es adecuado para ciertas microalgas que requieren luz solar. En este tipo de reactor, el medio de cultivo circula dentro de los tubos junto con la exposición a la fuente de luz y se recicla nuevamente al depósito mediante una bomba. Es importante mantener el régimen de flujo altamente turbulento en el reactor para evitar la floculación de microalgas. Una vez que el medio circula, se debe recolectar una parte de este para permitir la operación continua del sistema [60].

Fotobiorreactores de serpentín: Los reactores de serpentín representan los sistemas cerrados más antiguos desarrollados. Consisten en tubos rectos conectados por curvas en U para formar un bucle plano que puede disponerse tanto vertical como horizontalmente. El intercambio de gases y la adición de nutrientes normalmente tienen lugar en un recipiente separado, y la circulación del cultivo (a velocidades de flujo entre 20 y 30 cm s⁻¹) se logra mediante una bomba o un elevador de aire [72].

Fotobiorreactor de tanque agitado: Básicamente, el tanque agitado utilizado en el cultivo de microalgas se deriva del diseño del tanque de fermentación. Los conceptos son similares, mientras que las diferencias que se pueden distinguir para el cultivo de microalgas son la necesidad de agregar una fuente de luz externa adicional al diseño. Para esta mezcla del medio de cultivo se ayuda el movimiento mecánico del agitador que también asegura una óptima transferencia de calor y masa. Se ha informado que el tanque agitado muestra un buen rendimiento, ya que proporciona una muy buena mezcla y transferencia en cultivos de interior, donde la adición de aireación podría proporcionar una mejor solubilidad del gas. A pesar de eso, este reactor tiene una baja relación área superficial/volumen que reduce la eficiencia fotosintética de las microalgas. También se debe tener en cuenta el medio utilizado para el cultivo. Los fotobiorreactores de tanque agitado se utilizan actualmente solo a pequeña escala de laboratorio, ya que los recipientes más grandes pueden tener problemas con suficiente iluminación [60].

Fotobiorreactor de panel plano: El panel plano es el diseño más común de un fotobiorreactor (PBR), que consta de dos láminas de vidrio transparentes o semitransparentes que se asemejan a una caja rectangular que están conectadas en cascada hacia la fuente de luz. Pueden colocarse verticalmente o inclinarse en ciertos ángulos para recibir la máxima intensidad de luz del sol o de una fuente de luz. También tiene un camino de luz muy corto que permite una fácil penetración de la luz en las microalgas y, por lo tanto, es adecuado para cultivos tanto en exteriores como en interiores. El rociador de aire en el PBR genera burbujas de aire que se suministran a la bomba que ayudan a mezclar y hacer circular el medio de cultivo. En particular, los beneficios del sistema de panel plano son proporcionar una alta relación de área superficial a volumen para la iluminación, un diseño flexible para el proceso de escalado y una baja cantidad de acumulación de oxígeno. Sin embargo, este diseño también posee

algunas limitaciones conocidas, como la aireación que provoca estrés hidrodinámico y la formación de bioincrustaciones en la superficie. También existe la posibilidad de que la biomasa se adhiera a las paredes del biorreactor y el daño potencial por alto estrés causado por la aireación. El control de la temperatura dentro del fotobiorreactor de panel plano también plantea un problema, pero esto se puede resolver utilizando sistemas de rociadores o un sistema de intercambio de calor [60].

2.7.5. Cosecha de Microalgas

La recolección de microalgas puede incluir métodos mecánicos, químicos, biológicos o eléctricos, cada uno de los cuales tiene sus propias ventajas y desventajas [63]. Generalmente implica uno o más pasos de separación sólido-líquido, que son los principales cuellos de botella económicos que afectan la producción de biodiésel de microalgas a gran escala y el tratamiento de aguas residuales basado en microalgas. El proceso de cosecha de microalgas generalmente representa del 20 al 30% del costo total de producción de biodiésel de microalgas [68]. No existe un único método de recolección más adecuado para cada género de microalgas; en general, lo ideal es utilizar un método que preserve la composición de la biomasa y no dificulte la recuperación del producto de interés. Los métodos de recolección más comunes incluyen filtración, centrifugación, flotación, floculación, electrofloculación, sedimentación por gravedad, proceso electrolítico, electroforesis y separación magnética. Sin embargo, la combinación de métodos de cosecha con un paso previo de espesamiento por coagulación/floculación química o biológica puede aumentar la eficiencia del proceso y reducir los costos operativos [63].

Métodos de Cosecha

Centrifugación: La centrifugación es el proceso más común para la recolección de microalgas, ya que es un método rápido y eficiente para la recuperación de células [68]. La centrifugación es un método físico de deshidratación que depende de la generación de una fuerza centrífuga que actúa radialmente y acelera el movimiento y la separación de las partículas en función de la diferencia de densidad entre la partícula y el medio que la rodea. En este caso, la partícula más densa se moverá hacia afuera mientras que las partículas menos densas se moverán hacia adentro. La centrifugación es fiable para separar soluciones muy diluidas utilizando velocidades de rotación adecuadas. En este contexto, el proceso de separación se basa principalmente en el tamaño de partícula y la diferencia de densidad de los componentes del medio. Al utilizar este método, se puede lograr una mayor concentración de biomasa y una alta eficiencia de cosecha en un corto período de tiempo. La eficiencia del proceso de centrifugación general depende principalmente de las características de sedimentación de las celdas, el tiempo de retención de la suspensión en la centrífuga (que está controlado por el caudal) y la profundidad de sedimentación que se puede minimizar mediante el diseño de la centrífuga [73]. Se han informado varios tipos de centrífugas como placa espiral, flujo continuo, pila de discos autolimpiantes, descarga de boquilla y recipiente decantador para la recolección de diferentes especies de microalgas y consorcios mixtos de microalgas [2]. Aunque se considera uno de los métodos más eficientes, con rendimientos de hasta

el 98%, las principales desventajas son los altos costos de energía y el hecho de que las fuerzas gravitatorias y de corte durante el proceso de centrifugación pueden dañar la estructura celular [68]. Otra ventaja principal de este método es que no se requieren aditivos químicos. En consecuencia, en este caso es posible el almacenamiento de biomasa durante un largo período de tiempo conservando la calidad [73].

Sedimentación: Entre todos los métodos mecánicos, la sedimentación por gravedad es un método simple y rentable. En este método, la sedimentación de las células se produce debido al tamaño de las células. Este método es principalmente adecuado para cultivos mixtos con células grandes y pesadas, donde la sedimentación se produce debido a su mayor tamaño. Pero, este proceso no se puede utilizar a gran escala debido a la lenta velocidad de sedimentación que consume mucho tiempo. Este proceso puede recuperar solo del 0,5 al 3% del contenido sólido. Además, dependiendo de las especies de microalgas que se cosechen, se puede recuperar del 10 al 90 % de la biomasa [2].

Floculación: La floculación se puede utilizar como paso previo a la recuperación de biomasa, ya que consiste en la aglomeración de microalgas, facilitando y aumentando la eficiencia de los procesos posteriores [68]. Las células de microalgas se suspenden fácilmente en medios de cultivo porque las cargas superficiales de las células de microalgas tienen carga negativa. En el proceso de floculación, se emplean electrodos con carga positiva y polímeros catiónicos para desestabilizar los cultivos de biomasa de microalgas y aumentar la densidad celular mediante la formación de flóculos de algas [63]. La carga de repulsión entre las microalgas se neutraliza o reduce mediante el uso de floculantes como las sales de sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$), cloruro de hierro ($FeCl_3$) y sulfato de hierro ($Fe_2(SO_4)_3$), entre otros [68]. Aunque los floculantes químicos son rentables y eficientes, pueden contaminar la biomasa de microalgas junto con la calidad del efluente debido a los monómeros hidrolizados, lo que lleva a una aplicación inadecuada para fines alimentarios, nutracéuticos y aditivos para piensos. Varios floculantes químicos también pueden afectar negativamente a los componentes bioquímicos de las células de microalgas, como proteínas, almidones y lípidos, lo que reduce el valor nutritivo de la biomasa de microalgas obtenida [63].

Filtración: La filtración también es un método común para la recolección de microalgas. Consiste en recuperar la fase sólida (biomasa de microalgas) de la fase líquida (medio de cultivo) a través de las mallas de un filtro o membrana. Los procesos de filtración convencionales son la filtración al vacío, la filtración a presión, la microfiltración, la ultrafiltración, la filtración sin salida y la filtración de flujo tangencial. Las técnicas de ultrafiltración y microfiltración (utilizando membranas de poros más pequeños) se utilizan para recuperar biomasa en cultivos de microalgas más pequeños. El proceso puede recuperar del 70 al 90 % de biomasa. En el proceso de filtración, el medio que contiene microalgas pasa a través de una membrana porosa de un tamaño particular [2,63]. Es uno de los principales procesos de cosecha debido a la facilidad de escalado y la ausencia de contaminantes químicos en los productos finales. Además, permite casi el 100 % de la recuperación celular y los medios recuperados también son aptos para su reutilización. El rendimiento y la capacidad antiincrustante dependen en gran medida de las propiedades químicas de la membrana polimérica (como la porosidad, la carga superficial), las especies de microalgas, la concentración de biomasa y el modo de

filtración [63]. Los principales costos de este proceso están asociados con el reemplazo frecuente de las membranas de filtración debido a la obstrucción y al consumo de energía del sistema de bombeo, pero en comparación con otros métodos de recolección, la filtración es uno de los más eficaz y económicamente competitiva [68].

Flotación: La flotación es otro método simple utilizado para facilitar la recolección de biomasa. La flotación puede verse simplemente como una sedimentación por gravedad al revés. En el proceso de flotación, se introducen microburbujas de aire y se adhieren a las partículas desestabilizadas para permitir que las partículas se eleven y floten hacia la superficie del líquido y luego se eliminan con un skimmer [63,68]. Sobre la base del tamaño de la burbuja, se han utilizado varios tipos de métodos de flotación como la flotación por aire disuelto (DAF), la flotación por aire disperso, la flotación electrolítica y la flotación dispersa por ozonización (ODF) para la recolección de diferentes especies de microalgas de agua dulce. El proceso tiene varias ventajas, como que requiere menos área, tiene un tiempo de operación corto, proporciona una recuperación de biomasa del 50 al 90% y se puede escalar a nivel industrial. El principal problema de este proceso es que consume mucha energía y también que el proceso utiliza floculantes químicos que podrían dificultar el procesamiento posterior [2].

2.7.6. Extracción de lípidos

Pretratamientos

Los métodos de pretratamiento se utilizan para aumentar la recuperación de los componentes intracelulares de las microalgas, que pueden llevarse a cabo mediante métodos químicos (por ejemplo, ácidos, bases, fluidos supercríticos), métodos físicos (por ejemplo, liofilización, sonicación, microondas, ultrasonografía), métodos biológicos (degradación de enzimas o proteínas) y métodos mecánicos (ej., autoclave a alta temperatura, prensado, molienda de bolas, electroporación, homogeneización y choque osmótico). La preservación de la composición química en la biomasa de microalgas es un factor importante para seleccionar el método de pretratamiento, ya que los componentes químicos de la biomasa pueden degradarse tanto por el proceso de extracción como por la actividad enzimática presente en el interior de las células de las microalgas. Además, la elección del método a utilizar para romper la pared celular y la membrana depende de la morfología de las células [68].

Métodos de Extracción

La principal limitación del proceso en la producción de biodiésel de microalgas es la rentabilidad y la eficiencia de la extracción de lípidos, ya que las diferentes cepas de microalgas tienen estructuras y composiciones diferentes. En ciertos casos, algunas de las microalgas se pueden extraer fácilmente, mientras que otro, el lípido podría estar contenido dentro de las células, envuelto por paredes celulares resistentes que necesitan ayuda adicional para extraerlas [14]. El contenido de lípidos en las microalgas puede alcanzar hasta el 75% de su biomasa, dependiendo de las condiciones de cultivo y la cepa/especie elegida. Los lípidos obtenidos de las microalgas se pueden utilizar como

materia prima para biocombustibles o biomateriales. La producción de lípidos de las microalgas puede ser hasta 20 veces mayor en comparación con las plantas de semillas oleaginosas. El contenido de lípidos de las microalgas se puede modificar dependiendo de la fisiología de las microalgas, su fase de crecimiento y las condiciones ambientales, por ejemplo, temperatura, salinidad y nutriente, y el rendimiento de extracción dependiendo del método y disolventes utilizados [74]. Hay una amplia gama de métodos informados para la extracción de lípidos. La selección de un determinado método depende de su eficiencia, rentabilidad, precisión, aplicabilidad, capacidad de extracción y, lo más importante, precisión y reproducibilidad. En general, la extracción de lípidos se puede realizar tanto por métodos químicos como por métodos mecánicos [33].

Los métodos químicos ampliamente investigados para la extracción de lípidos de células de algas consisten principalmente en métodos de extracción por solventes y métodos de extracción supercríticos [33]. La extracción con solventes orgánicos es la técnica más común para extraer componentes de microalgas. En la extracción de lípidos a base de solventes a partir de biomasa húmeda, es necesario aumentar la polaridad del solvente para reducir la barrera entre los solventes no polares y los lípidos intracelulares [68]. El fundamento de los métodos de extracción con solventes es el siguiente: los solventes orgánicos polares como el etanol pueden interrumpir los enlaces de hidrógeno entre los lípidos polares; y los disolventes orgánicos no polares pueden alterar las interacciones hidrofóbicas entre los lípidos no polares o neutros. Se pueden aplicar varios solventes orgánicos para la extracción de lípidos, por ejemplo, hexano, etanol, cloroformo o sus mezclas, y se puede extraer hasta el 98% de los lípidos de la biomasa seca. La extracción con fluidos supercríticos también se aplica bien en la práctica, como la extracción con agua subcrítica, la extracción con metanol supercrítico y la extracción con dióxido de carbono supercrítico. La extracción con fluidos supercríticos requiere una alta presión y temperatura para romper las células de microalgas. La ventaja de este método radica en que no se contaminan los compuestos y, por lo tanto, la biomasa residual se puede usar directamente como alimento para animales, fertilizantes o sustratos para la digestión anaeróbica. Sin embargo, la inversión de capital es alta y requiere una gran presión, lo que limita la aplicación práctica [33].

Hay dos métodos para descomponer la membrana celular: mecánico y no mecánico. Los métodos mecánicos son ultrasonidos, homogeneización a alta presión, prensado, molino de bolas, microondas, mientras que los métodos no mecánicos son choque osmótico, descomposición química y enzimas. Para la ampliación industrial, los métodos mecánicos tienen la ventaja de ser rápidos y controlables. Sin embargo, su consumo de energía es alto [74]. El método mecánico se emplea inicialmente para romper la membrana celular mediante trituración, prensado, batido de perlas, trituración, aplicación de microondas, sonicación o adición de NaCl, antes de la aplicación de los solventes de extracción. La elección del método de disrupción depende de la condición de la pared celular, el tamaño de la célula del alga y la escala de aplicación [33]. Para mejorar la eficiencia de la extracción, la disrupción mecánica a menudo se aplica en combinación con métodos de solventes. Por ejemplo, el microondas y la sonicación a menudo son asistidos con solventes para la extracción de lípidos, ya que son eficientes, rápidos, económicos y ecológicos. Por lo tanto, se requiere menos cantidad de disolvente. Recientemente, también se ha estudiado bien la utilización directa de biomasa de algas húmedas para

extraer lípidos. De esta forma, la deshidratación no es necesaria después de la cosecha de biomasa, lo que ahorra consumo de energía y, por lo tanto, mejora la rentabilidad [68].

2.8. Ácidos grasos

Los lípidos de microalgas se componen típicamente de glicerol, azúcares o bases esterificadas a ácidos grasos, que contienen entre 12 y 24 carbonos, incluidos los ácidos grasos de cadena media (C10-C14), cadena larga (C16-18) y cadena larga (C20-C24). Los ácidos grasos insaturados se denominan ácidos grasos saturados (SFA), los que tienen un solo enlace insaturado se denominan ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), los que tienen más de dos son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los ácidos grasos saturados corresponden a la mayor fracción de lípidos y, en algunas especies, los ácidos grasos insaturados pueden representar entre el 20% y el 60% de los lípidos totales. Los triacilgliceroles son los preferidos para producir biodiésel debido a su alto contenido en ácidos grasos (estructura del glicerol con tres ácidos grasos) y la ausencia de otros constituyentes químicos además del glicerol, como ocurre en los fosfolípidos o glicolípidos [74].

2.8.1. Conversión de lípidos a biodiésel

Los ácidos grasos que conforman los lípidos, son utilizados generalmente para la producción de biodiésel. Se necesita un proceso de conversión después de la extracción de lípidos de las microalgas para dicha producción, debido a la alta viscosidad del aceite extraído que se utilizará como combustible. El lípido crudo podría arruinar los motores rápidamente debido a la rápida acumulación de lodos de aceite. Por lo tanto, la viscosidad del aceite de microalgas debe reducirse para producir un combustible sostenible que ofrezca un funcionamiento suave del motor [14]. Los ésteres metílicos de ácidos grasos, que son los ingredientes efectivos del biodiésel, un combustible alternativo para los motores diésel, se producen mediante transesterificación. La transesterificación (Fig. 8) convierte los lípidos de algas (triacilgliceroles y/o ácidos grasos libres) en biodiésel no tóxico, renovable y biodegradable para el consumo en motores como combustible de transporte. Dado que la transesterificación es una reacción de equilibrio, se requiere el suministro de exceso de alcohol para mejorar la velocidad de reacción y promover el cambio de equilibrio hacia la dirección de formación del producto. Los alcoholes comunes empleados para la transesterificación generalmente consisten en etanol, metanol, butanol, propanol y alcohol amílico. En la literatura, el metanol y el etanol se aplican más ampliamente, pero se prefiere el metanol ya que es barato y tiene ventajas físicas y químicas. Tres moléculas de metanol reaccionan con una molécula de cada triglicérido en los lípidos de las microalgas para producir una molécula de glicerol, el subproducto, y tres moléculas de ésteres metílicos, los productos del biodiésel [33].

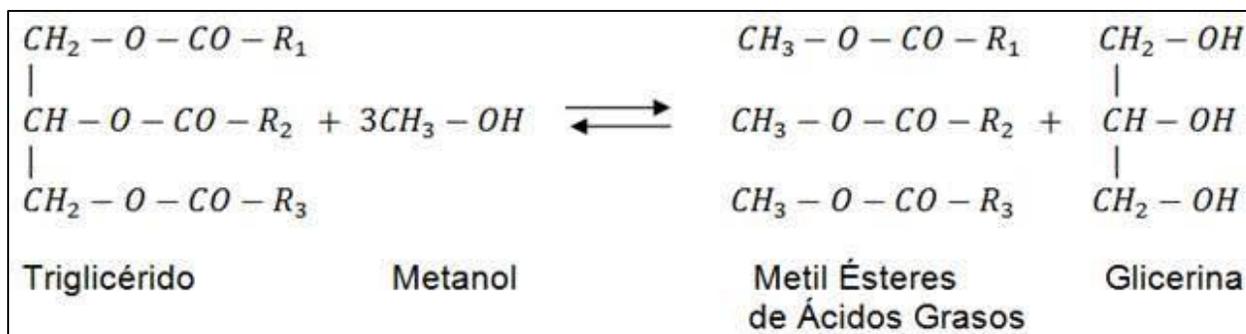


Figura 8 .Proceso de transesterificación de triglicéridos a metil ésteres de ácidos grasos (biodiésel) [75]. R₁, R₂, y R₃ son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas).

2.9. Biorremediación ambiental con microalgas

Las microalgas, de manera adicional a las aplicaciones energéticas, poseen la habilidad de sobrevivir en diferentes medios de crecimiento, como son el agua de mar, agua residual y efluentes varios, así como de acumular un ilimitado número de compuestos valiosos, incluidos pigmentos, proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas y numerosas sustancias bioactivas [24]. De esta forma, las microalgas pueden ser utilizadas para diferentes aplicaciones comerciales, como son el tratamiento de agua residual y mitigación de CO₂, la nutrición humana, como alimento para animales y la vida acuática, producción de cosméticos, compuestos de alto valor, pigmentos, como la astaxantina, β-caroteno y ficobiliproteínas, la producción estable de isótopos, de biofertilizantes, síntesis de antimicrobianos, antiviral, antibacterial y medicina anticáncer [44].

El uso de microalgas para la fitorremediación acoplada con la producción de biomasa está teniendo recientemente atención considerable, puesto que se puede convertir los nutrientes disponibles libres en el agua residual (particularmente el nitrógeno, N y el fósforo, P) en biomasa microalgal, al mismo tiempo que se fija el dióxido de carbono por medio de la fotosíntesis; además, la mayoría de las microalgas, son capaces de crecer en ambientes ricos en nutrientes, absorbiendo éstos y a los metales del agua residual, condición que lo convierte en un medio atractivo para el tratamiento sustentable y de bajo costo de agua residual [14].

En general, los distintos tipos de agua residual tienen contenido similar de compuestos orgánicos, mientras que los compuestos inorgánicos difieren. Tres cuartos del carbón orgánico está presente como carbohidratos, grasas, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles, mientras que los constituyentes inorgánicos incluyen grandes concentraciones de sodio, calcio, potasio, magnesio, cloro, azufre, fosfato, bicarbonato, sales de amonio y metales pesados. Lo que hace al agua residual un excelente sustituto de un medio de cultivo ideal, demasiado caros para su uso a gran escala. Además, el agua residual contiene nitratos y fosfatos, que generalmente son descargados en los cuerpos de agua natural causando eutrofización y pérdida de vida acuática, mismos que son usados por las algas para su desarrollo y crecimiento, por lo que pueden ser empleadas como un método terciario de tratamiento de agua residual [60].

Por otro lado, algunos componentes del agua residual podrían inhibir el crecimiento de las algas, como son grandes cantidades de amonio, la presencia de algunas toxinas como el cadmio o mercurio o de químicos orgánicos; mientras que, entre los factores bióticos que pueden impactar negativamente el crecimiento algal, se encuentran, las bacterias patogénicas o el zooplancton depredador. Adicionalmente, otros microorganismos en el agua residual podrían competir con la microalga por los nutrientes esenciales. La concentración del inóculo es también un factor crítico para el crecimiento de la población completa [59].

Este enfoque, tiene beneficios comunitarios y comerciales, ya que, en el tratamiento de aguas residuales se consigue una alta degradación de los contaminantes, la tierra fértil es menos impactada en comparación con otros cultivos oleaginosos, los nutrientes están libremente disponibles en el agua y pueden ser reciclados, la biomasa o proteínas refinadas pueden ser usados como cualquier generador de energía agrícola y otros productos de valor, pueden ser también refinados. A pesar de estos aspectos favorables siguen existiendo limitaciones económicas, biológicas y logísticas significativas, las cuales se deben superar si se espera realizar el proceso completo [76].

El tratamiento de aguas residuales acoplado con la producción de biocombustibles a través del cultivo de microalgas es una alternativa que está recibiendo atención considerable [77]. El crecimiento de microalgas bajo condiciones de cultivo de alta biomasa tiene un gran potencial en la generación de biocombustibles, puesto que se ha demostrado su capacidad para producir altas concentraciones de lípidos mediante el uso de los nutrientes en aguas residuales. Las microalgas reproducidas en este tipo de medio, tiene una acumulación de lípidos que va desde el rango bajo (<10% DW) a moderado (25-30% DW), aunque, en algunos estudios se ha observado una relativa alta productividad [59].

Con respecto a los nutrientes en este medio, varios estudios dan a conocer la exitosa remoción de nitrógeno y fósforo del agua residual, y, respecto al cultivo microalgal, el impacto ambiental, en comparación del uso de agua fresca y los costes de producción, debido a los requerimientos de nutrientes, se ven significativamente reducidos cuando el agua residual es usada como medio de cultivo [47].

El N y el P se presentan en el agua residual en forma de NH_4^+ (amonio), NO_3^- (nitratos), NO_2^- (nitritos) y PO_4^{3-} (fosfatos). El nitrógeno, es un constituyente clave para muchas biomoléculas, como son los aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofilas, entre otros; es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato o como amonio. Es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas, ya que numerosos estudios muestran que la biosíntesis y la acumulación de lípidos se potencian en cultivos de microalgas limitados en nitrógeno [78-80].

El fósforo es otro macronutriente que desempeña un papel importante en los procesos metabólicos celulares mediante la formación de muchos componentes estructurales y funcionales necesarios para el crecimiento normal, el desarrollo y la reproducción de

microalgas, tales como, la formación de ácidos nucleicos, transferencia de energía y el contenido de lípidos y composición de ácidos grasos [79].

Capítulo 3. Metodología

3.1. Aislamiento e identificación de las cepas

La microalga *Chlorella* sp. y *Leptolyngbya* sp. fueron aisladas de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Tuctlán, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. El aislamiento se llevó a cabo mediante el método de diluciones seriadas (Anexo 1) [81]. Posteriormente, para completar el aislamiento de las microalgas y al mismo tiempo purificar el cultivo, se utilizó la dilución seleccionada para ser inoculada en placas de agar con medio BG11 (Fig. 9) (el cual contiene los siguientes compuestos (mg L^{-1}): NaNO_3 (1500), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (40), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_{14}$ (6), $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (1), Na_2CO_3 (20), H_3BO_3 (2.86), $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.222), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.079), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.39), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.049)) (Fig. 1) [82].

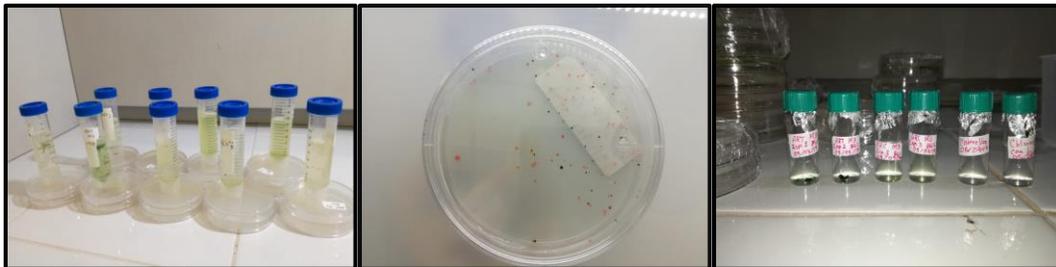


Figura 9. Aislamiento por medio de diluciones seriadas en placas Petri con agar y medio BG11.

La identificación morfológica de las microalgas obtenidas se realizó mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (DCI), utilizando el equipo Nikon 80i y Nikon EFD-3 Optiphot, en el “Laboratorio de Algas Continentales Ecología y Taxonomía” (LACET), perteneciente al Departamento de Biología Comparada, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La identificación taxonómica se realizó comparando las características morfológicas de las microalgas identificadas, siendo analizadas y determinadas con base en las claves dicotómicas [83,84].

3.2. Cultivo de microorganismos y diseño experimental

El agua residual utilizada en esta investigación se sintetizó de la siguiente manera: dextrosa anhidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 260.2 mg L^{-1} ; carbonato de sodio (NaCO_3) 200 mg L^{-1} , sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 10 mg L^{-1} , sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 10 mg L^{-1} , cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mg L^{-1} , y 1 mL de una solución madre de trazas de metales. La composición de la solución madre de metales traza fue ácido bórico (H_3BO_3) 0.15 g L^{-1} , sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.03 g L^{-1} , yoduro de potasio (KI) 0.18 g L^{-1} , cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.12 g L^{-1} , molibdato de sodio dihidrato ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.06 g L^{-1} , sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.12 g L^{-1} , cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.15 g L^{-1} , sulfato ferroso heptahidratado

($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 10 g L^{-1} , cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 g L^{-1} , EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$) 10 g L^{-1} . Se utilizaron soluciones madre de cloruro de amonio ($10 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$) y fosfatos de potasio dibásico trihidrato ($10 \text{ g L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), para ajustar las soluciones a las diferentes concentraciones requeridas en la experimentación [85,86]. Para los rangos de amonio y fosfato utilizados en el diseño, se consideró la concentración de iones de NH_4^+ y PO_4^{3-} en cada medio.

Los cultivos previos a la realización del experimento, se mantuvieron en un cepario (Fig. 10) el cual se mantuvo a $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, con una iluminación de 3000 luxes, con lámparas de luz LED de 22 Watts, con ciclos luz: oscuridad de 12:12 h. Se realizó una Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) basada en un diseño compuesto central (DCC), para optimizar los niveles de las variables establecidas. Estas variables fueron concentración de amonio (NH_4^+), concentración de fosfatos (PO_4^{3-}) e iluminación (luxes). Los rangos utilizados para amonio y fosfatos fueron de 10 a 100 mg L^{-1} y de 5 a 50 mg L^{-1} , respectivamente. Las concentraciones de amonio y fosfatos utilizados se establecieron considerando la cantidad típica de estos compuestos presentes en las aguas residuales municipales [8,25]. El rango de iluminación fue de 1000 a 5000 luxes [9].

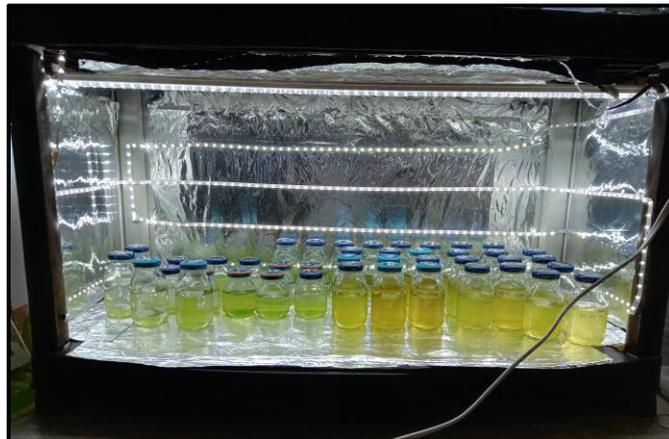


Figura 10. Cepario de microalgas.

Cada variable fue evaluada en 5 niveles codificados (-1,68, -1, 0, 1, 1,68). El diseño experimental consistió en 20 tratamientos ($= 2k + 2k + 6$) para cada microalga, donde k es el número de variables independientes, cada tratamiento con dos réplicas (Figura 11 a y b). La ecuación polinomial de segundo orden (Ec. (1)) para la predicción de un punto óptimo se expresa de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 \sum_i \beta_i X_i + \sum_{ii} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde:

Y es la respuesta pronosticada

X_i, X_j son variables independientes

β_0 es el término compensado

β_i es el coeficiente de regresión para términos de primer orden

β_{ii} es el coeficiente para términos cuadráticos puros

β_{ij} es el coeficiente de interacción.

Las variables, con sus respectivos rangos y unidades codificadas, así como sus respuestas se muestran en la Tabla 2. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), que incluye la prueba F y el coeficiente de determinación R^2 , que mide la bondad de la regresión. de ajuste del modelo. Los gráficos de superficie de respuesta de las respuestas predichas del modelo se utilizaron para evaluar la interacción entre las variables significativas. Los experimentos se llevaron a cabo con lámparas de luz LED [87]. La temperatura se mantuvo a 25 ± 5 °C y ciclos de luz:oscuridad 12:12. Los cultivos se mantuvieron durante 15 días, hasta que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 11) [4].



a) b)
 Figura 11 Crecimiento de microalgas en reactores de 120 ml bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes.
 a) Microalga *Chlorella* sp. b) Microalga *Leptolyngbya* sp.

3.3. Determinación del crecimiento de microorganismos

La concentración de microalgas en el cultivo se determinó cada dos días por densidad óptica (DO), utilizando el espectrofotómetro UV-VIS-NIR (modelo UV-3600 marca SHIMADZU) a una longitud de onda establecida de 550 nm [88,89]. Estas pruebas se realizaron en el “Laboratorio de Caracterización de Materiales” del Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

El rendimiento de biomasa se determinó por la técnica de gravimetría, tomando muestras al inicio y al final de cada tratamiento, como se muestra en la siguiente Ec. (2):

$$P_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

Donde:

P_x es el rendimiento de la biomasa

X_0 y X_1 son las productividades de biomasa al inicio y final de cada muestreo

t_0 y t_1 son el tiempo inicial y final de cada muestreo

Para este procedimiento, cada matraz fue homogeneizado. Luego se tomó una muestra de 10 mL, la cual se filtró en papel de fibra de vidrio (Whatman) de 47 mm de diámetro con abertura de 1.6 μ m, para separar la biomasa del medio de cultivo, el cual se secó en estufa a 60 °C para determinar el peso seco mediante diferencias de pesos [4].

La tasa de crecimiento específica (μ_e , d^{-1}), en todos los experimentos, se calculó utilizando la siguiente ecuación exponencial Ec. (3) [90]:

$$\mu_e = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0} \quad (3)$$

Donde:

\ln es el logaritmo natural

X_0 es la densidad de población inicial

X_1 es la densidad después del tiempo t (días).

3.4. Determinación de clorofila

Los pellets de biomasa se obtuvieron centrifugando 5 mL del cultivo a 3500 rpm durante 15 min; el sedimento celular se resuspendió en 5 mL de metanol y se calentó durante 10 min a 60 °C. Las muestras obtenidas se refrigeraron durante 24 h en la oscuridad y posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 3500 rpm. Los sobrenadantes obtenidos se llevaron al volumen original de 5 mL con metanol y se midió su absorbancia a 653 y 666 nm de longitud de onda. Los cálculos se realizaron utilizando las siguientes fórmulas (Ec. (4 y 5)) [91]:

$$\text{Clorofila a} = 15.65 (A_{666}) - 7.34 (A_{653}) \quad (4)$$

$$\text{Clorofila b} = 27.05 (A_{653}) - 11.21 (A_{666}) \quad (5)$$

3.5. Eficiencia de remoción de nutrientes

Las muestras de microalgas se centrifugaron (4000 rpm, 4 °C durante 15 minutos) y el sobrenadante se utilizó para evaluar la concentración de nutrientes en cada tratamiento. El contenido de fósforo, en forma de fosfatos (PO_4^{-3}) y nitrógeno, en forma de amonio (NH_4^+), se analizó por colorimetría al inicio y al final de cada tratamiento (Fig. 12) [11].

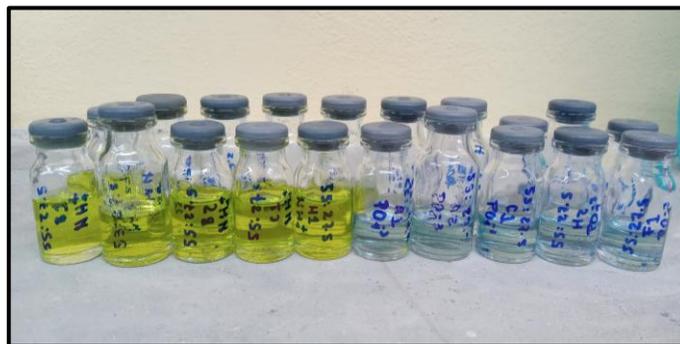


Figura 12 Análisis de concentración de amonio y fosfatos.

3.5.1. Concentración de amonio (NH_4^+)

Para las pruebas de amonio (Fig. 13) se usaron 10 ml muestra filtrada, a la cual se agregó 0.2 ml de reactivo RN_1 , 0.2 ml de reactivo RN_2 y 0.2 ml de reactivo RN_3 y se esperó durante 10 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 630 nm.

Los reactivos se prepararon de la siguiente manera:

RN_1 : Se disolvieron 2 g de EDTA disódico $2\text{H}_2\text{O}$ en 70 ml de agua destilada calentando, para después adicionar 25 g de citrato sódico tribásico $2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de nitroprusiato sódico y finalmente completar hasta 100 ml con agua destilada.

RN_2 : Se disolvieron 2.75 g de NaOH en 50 ml de agua destilada, se dejó enfriar y se añadieron 8 ml de fenol líquido, para finalmente completar hasta 100 ml con agua destilada.

RN_3 : Se disolvieron 4 g NaOH en 30 ml de agua y se agregaron 50 ml de hipoclorito, 7% Cl_2 , para finalmente completar hasta 100 ml con agua destilada.



Figura 13. Muestras pigmentadas para la realización de la curva de calibración de amonio (NH_4^+).

La curva de calibración (Fig. 14) se llevó a cabo usando una disolución madre de 1000 ppm, a la cual se le agregó 4.714 g de amonio sulfato anhidro aforado a 1 L con agua destilada y se le agregó 0.3 ml de cloroformo. De la disolución madre se realizó la dilución 1:100, para la disolución estándar intermedia de amonio de 10 ppm, de esta, se agregaron 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml en tubos de reacción y se completaron a 10 ml con agua destilada, al mismo tiempo que se preparó un blanco con 10 ml de solo agua destilada. Finalmente se procedió con la adición de los reactivos indicados. La regresión lineal realizada a partir de los datos obtenidos se puede observar en la Fig. 6.

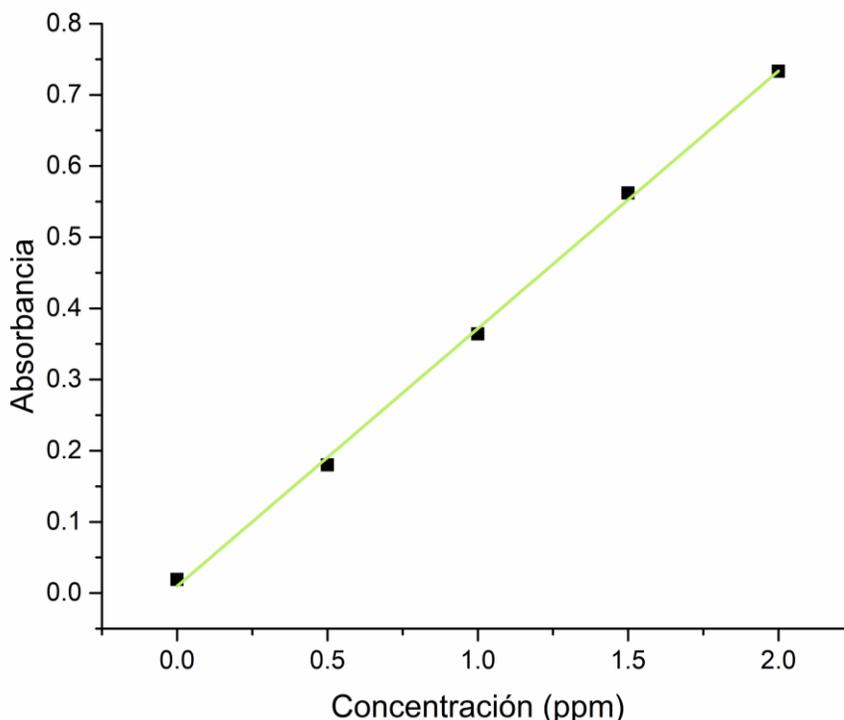


Figura 14. Curva de calibración de amonio (NH_4^+).

Los datos obtenidos de la regresión de la gráfica fueron (Ec. 6):

$$y = 0.362x + 0.0096 \quad (6)$$

$$R^2=0.9989$$

3.5.2. Concentración de fosfatos (PO_4^{3-})

A 5 ml muestra filtrada se agregaron 0.4 ml reactivo RP_1 y 0.4 ml de reactivo RP_2 , las muestras se midieron por espectrofotometría UV-VIS a una absorbancia de 880 nm.

Los reactivos se prepararon de la siguiente manera:

RP_1 : Se adicionaron 4.3 g de amonio heptamolibdato decahidratado, 0.12 g de antimonio potasio tartrato y 27 ml de ácido sulfúrico concentrado en 250 ml de agua destilada.

RP_2 : Se agregaron 25 g de ácido ascórbico, 2.5 ml de ácido fórmico en 250 ml agua.

La curva de calibración se llevó a cabo usando una disolución madre a 1000 ppm a la que se le agregaron 4.394 g de potasio fosfato monobásico anhidro KH_2PO_4 aforado a 1000 ml con agua destilada, finalmente se le adicionaron 0.3 ml de cloroformo. De la disolución madre se realizó la dilución 1:100, para hacer la disolución estándar intermedia de fosfatos de 10 ppm.



Figura 15. Muestras pigmentadas para la realización de la curva de calibración de fosfatos (PO_4^{3-}).

Para la curva patrón (Fig. 15), se tomaron 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml de la disolución estándar intermedia y se agregaron en tubos de ensayo los cuales se completaron a 10 ml con agua destilada. De estos tubos se tomaron 5 ml y se agregaron a tubos de reacción, al mismo tiempo se preparó un blanco con 5 ml de solo agua destilada y finalmente se procedió con la adición de los reactivos indicados. La regresión lineal realizada a partir de los datos obtenidos se puede observar en la Fig.16.

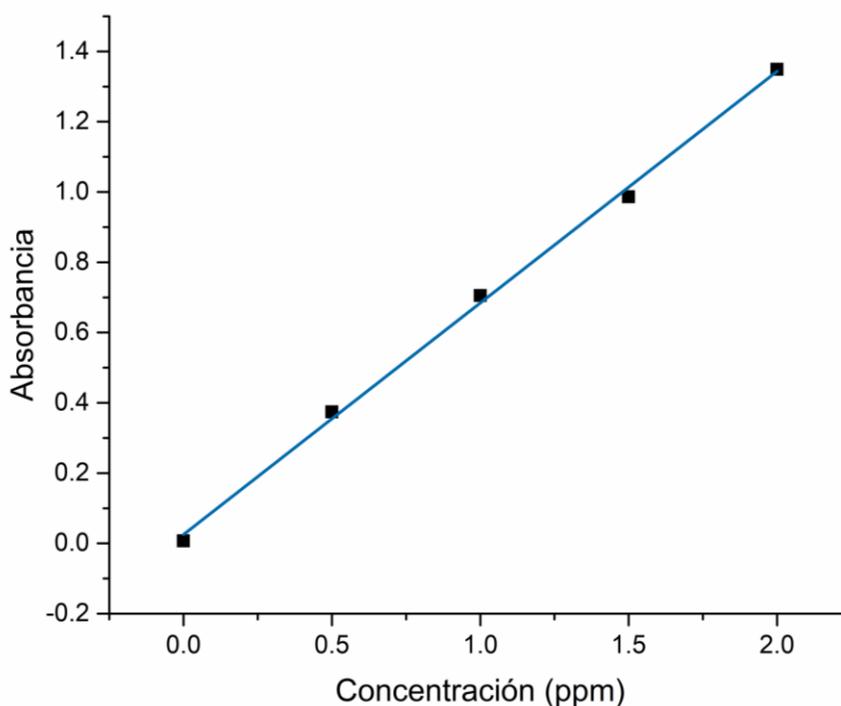


Figura 16 Curva de calibración de fosfatos (PO_4^{3-})

Los datos obtenidos de la regresión de la gráfica fueron (Ec. 7):

$$y = 0.6592x + 0.025 \quad (7)$$

$$R^2=0.9982$$

3.6. Extracción de lípidos

Para la extracción de lípidos se utilizó una muestra de 30 mL del cultivo de algas, la cual se colocó en la centrífuga a 4000 rpm durante 15 minutos para cosechar las células. El sedimento obtenido se resuspendió utilizando una solución de cloroformo:metanol (1:2) y un sonicador para acelerar la ruptura de la membrana y liberar el contenido celular. El paquete de células se separó de la mezcla de disolventes mediante centrifugación y el extracto de cloroformo:metanol obtenido se recuperó en tubos de ensayo. Se añadió la misma cantidad de agua al extracto para romper el equilibrio de la mezcla. Finalmente, la fase orgánica se recogió en viales tipo ámbar previamente fijados a peso constante. Para eliminar el solvente, los viales se secaron en estufa a 60 °C. La cuantificación de lípidos totales se determinó por diferencia de peso [92]. Luego, el lípido crudo se volvió a disolver en hexano y se almacenó en viales de vidrio sellados en la oscuridad a 5 °C [93]. El porcentaje de lípidos se calculó utilizando la siguiente ecuación [94].

$$\text{Contenido de Lípidos (\%)} = \left(\frac{\text{PL}}{\text{PM}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Dónde:

PL= peso seco de los lípidos totales

PM= es el peso seco de las microalgas

3.7. Perfil de ácidos grasos

Para conocer el perfil de ácidos grasos se utilizó un equipo de cromatografía de gases, por lo que las muestras se convirtieron a ésteres metílicos [94]. Estas pruebas fueron realizadas en laboratorios del departamento de Ingeniería Bioquímica del Tecnológico Nacional de México. La hidrólisis alcalina se llevó a cabo utilizando 100 µL de cada muestra y 1 mL de una solución de NaOH 0.5 M preparada con metanol grado HPLC. La reacción se llevó a cabo a 60 °C en un baño de agua con agitación constante. Después, se agregó 1 mL de BF₃/MeOH al 14%, y se mantuvo a 20 °C por 20 minutos, con agitación constante. La extracción de los ésteres metílicos se realizó utilizando 1 mL de hexano grado HPLC. Se inyectó 1 µL del extracto de hexano de cada una de las muestras, por triplicado, en análisis GC (Agilent Technologies modelo 5975 inert XL), equipado con una columna (DBWax) de 60 metros de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de entrada fue de 150 °C, la cual se mantuvo durante 5 minutos y posteriormente se elevó hasta 210°C usando una rampa de calentamiento de 30°C/min. De 210°C pasó a 213°C a una velocidad de 1°C/min, finalmente de esta temperatura pasó a 225°C a una velocidad de 20°C/min, durante 20 minutos haciendo un total de 30.6 minutos por corrida por muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector fue de 250°C, inyección Split con una relación de 50:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada una de las señales cromatográficas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL.

3.8. Análisis estadístico

Se utilizó el software Minitab® 17.1. PA, EE. UU. para el diseño del experimento, así como para obtener el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de regresión de los datos experimentales. Los gráficos y figuras se realizaron en OriginPro 2016.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1. Crecimiento de *Chlorella* sp. y *Leptolyngbya* sp. en agua residual sintética

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos, los cuales se numeran del 0 al 20, y en donde los tratamientos se presentan con los valores reales y codificados para las variables independientes establecidas. En la Figura 17 se puede observar la cinética de crecimiento, con respecto a la concentración celular de ambas especies de microalgas, para cada combinación de los factores establecidos con sus respectivos rangos, los cuales se obtuvieron para evaluar el crecimiento de las especies a lo largo de todo el tratamiento. Los puntos centrales del diseño (corridas 10 a la 15 de la Tabla 2) presentaron altas concentraciones de células (Fig. 17 (a y b)) así como alta productividad de biomasa (Tabla 2) para ambas cepas. Además, las corridas 16, 17, 18 y 19 de *Chlorella* sp., que fueron expuestas a una iluminación de 5000 luxes con concentraciones altas y bajas de amonio y fosfatos, así como las series 4 y 5, que tenían una concentración alta de amonio y fosfatos con baja iluminación y la corrida 20, con exceso de luz (6363.59 luxes), también obtuvieron altas concentraciones de biomasa. Mientras que para *Leptolyngbya* sp. los tratamientos con altas concentraciones de amonio, como las corridas 4, 5, expuestas a baja intensidad de luz (1000 luxes) y las corridas 18, 19 y 20, expuestas a mayor intensidad de luz (5000 y 6363.59 luxes), mostraron productividades de biomasa altas. Una alta concentración de nutrientes y una adecuada intensidad lumínica permiten una mayor producción de biomasa [95,66]. Todos los tratamientos de *Chlorella* sp. con alta iluminación tuvieron productividades altas de biomasa, mientras que, en el caso de las cianobacterias, las productividades más altas se debieron a las altas concentraciones de amonio, independientemente de la cantidad de luz. Una baja concentración de nitrógeno en el medio puede convertirse en un factor limitante en el crecimiento de *Leptolyngbya* sp. [95].

La corrida 20, que es un punto axial con exceso de luz (con 6363,59 luxes), a pesar de tener una alta concentración de biomasa, al comparar esta productividad de biomasa con otros tratamientos con las mismas concentraciones de amonio y fosfatos, pero a 3000 luxes, se observa una ligera inhibición en el crecimiento de ambas cepas se puede observar. La Fig. 17 muestra esta inhibición del crecimiento en el tratamiento 55:27,5:6363,59 (ensayo 20); *Leptolyngbya* sp. (Fig. 17 (a)) tuvo su máximo crecimiento el día 10, seguido de una disminución considerable en su concentración celular, mientras que *Chlorella* sp. (Fig. 17 (b)) tuvo una cinética de crecimiento máxima el día 6, seguida de una fase estacionaria prolongada. Las microalgas tienden a aumentar la producción de biomasa en condiciones de mucha luz, sin embargo, al seguir aumentando la cantidad de iluminación, se llega al punto de saturación, lo que genera una fotoinhibición celular, debido a la reacción de fotooxidación dentro de la célula por la formación de peróxido de hidrógeno en la presencia de oxígeno, que es tóxico para estos organismos [9,90]. Además, se ha demostrado que la mayoría de las cianobacterias de agua dulce prefieren intensidades de luz bajas debido a su baja tasa de mantenimiento de energía específica y composición de pigmentos [96].

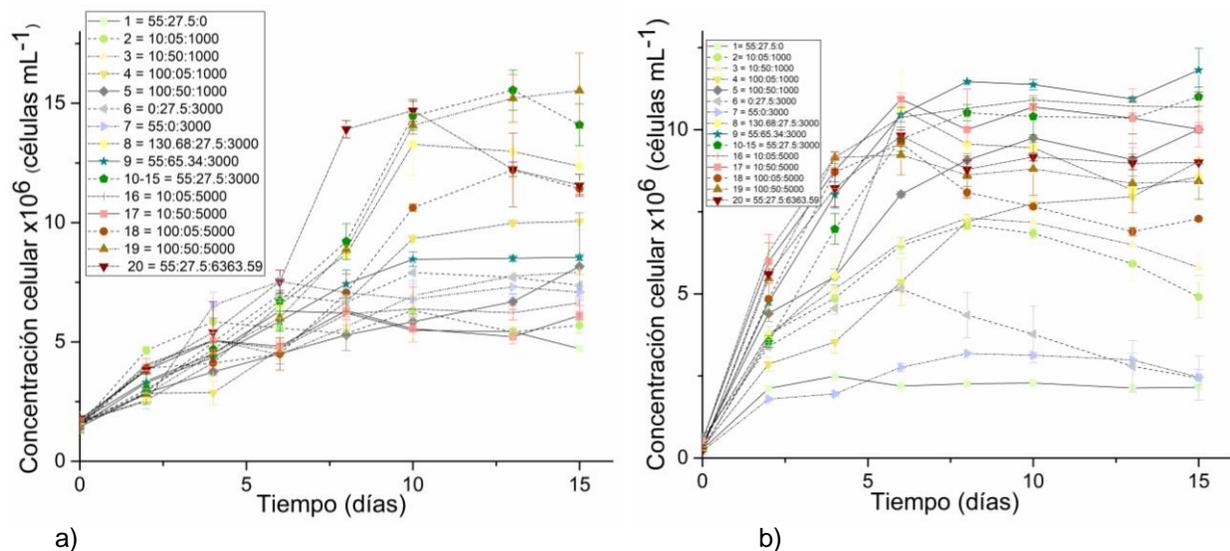


Figura 17. Cinética de crecimiento de microalgas cultivadas durante 15 días. a) Cinética de crecimiento de *Leptolyngbya* sp. b) Cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. Cada cinética fue etiquetada de acuerdo con el número de la corrida correspondiente con la Tabla 2 y las concentraciones de cada una de las variables independientes de los tratamientos (concentración de amonio:concentración de fosfatos:iluminación).

Tratamientos con menor producción de biomasa para *Chlorella* sp. fueron los tratamientos 2 y 3, con baja iluminación y concentración de amonio (a 1000 luxes y 10 mg L⁻¹ de amonio). Para *Leptolyngbya* sp. los tratamientos con menores concentraciones de amonio para intensidades de luz de 1000 y 5000 luxes en la Tabla 2 (2, 3, 16 y 17) mostraron un crecimiento celular similar entre ellos, aunque menor en comparación con los tratamientos con mayor concentración de amonio. Por otro lado, las microalgas alcanzaron concentraciones altas de biomasa para la corrida 9, punto axial con exceso de fosfatos (65.34 mg L⁻¹), mientras que la corrida 8, punto axial con exceso de amonio (130.68 mg L⁻¹), tuvo un menor crecimiento. Mientras que las cianobacterias presentan altas concentraciones de biomasa en ambos puntos axiales (8 y 9), observándose una mayor cantidad de biomasa para el tratamiento con mayor concentración de amonio. Mientras que en los puntos axiales con concentraciones mínimas de amonio y fosfatos (6 y 7), se observaron bajas concentraciones de biomasa para ambas cepas. Estos últimos tratamientos se cultivaron bajo estrés nutricional, debido a la ausencia de amonio o fosfatos, lo que provocó un menor crecimiento de microalgas [97]. Para ambas especies de microalgas, el cultivo en condiciones heterótrofas (sin luz), presentó las menores concentraciones de biomasa. La fase estacionaria de *Chlorella* sp. (Fig. 17 (b)) se alcanzó a partir del día 8 de crecimiento, mientras que para *Leptolyngbya* sp. (Fig. 17 (a)), esta fase se alcanzó el día 10 de la cinética, este comportamiento es común en las cianobacterias, las cuales tienen un crecimiento más lento en comparación con las clorofitas [38]. En general, la microalga, *Chlorella* sp., presentó una menor concentración celular, en comparación con las cianobacterias, *Leptolyngbya* sp.

Tabla 2. Diseño de matriz compuesta central de un factorial completo 2³, con variables independientes en unidades codificadas (entre paréntesis) y valores reales y cada una de las respuestas establecidas para la investigación.

C O R R I D A S	Variables			Respuesta											
	Conc. de NH ₄ ⁺	Conc. de PO ₄ ⁻³	Ilumina- ción	<i>Leptolyngbia</i> sp.						<i>Chlorella</i> sp.					
				Biomasa (mg L ⁻¹)	Lípidos (mg L ⁻¹)	Consumo de nutrientes (%)		Clorofila (mg L ⁻¹)		Biomasa (mg L ⁻¹)	Lípidos (mg L ⁻¹)	Consumo de nutrientes (%)		Clorofila (mg L ⁻¹)	
						NH ₄ ⁺	PO ₄ ⁻³	a	b			NH ₄ ⁺	PO ₄ ⁻³	a	b
1	55(0)	27.5(0)	0(-1.68)	130	63.33	25.32	20.91	0.03	0.12	43	31.67	18.75	49.55	0.19	0.42
2	10(-1)	5(-1)	1000(-1)	290	40	28.81	12.69	0.17	0.13	150	100	49.47	5.10	0.96	1.66
3	10(-1)	50(1)	1000(-1)	280	25	2.85	22.71	0.22	0.19	160	108.33	27.47	47.60	0.91	1.54
4	100(1)	5(-1)	1000(-1)	470	46.67	17.81	14.50	0.50	1.19	300	175	65.09	10.34	3.27	5.56
5	100(1)	50(1)	1000(-1)	450	66.67	32.01	37.57	0.67	1.70	310	168.33	54.89	46.11	3.91	6.50
6	0(-1.68)	27.5(0)	3000(0)	220	85	3.50	40.93	0.03	0.08	110	58.33	3.62	21.31	0.35	0.50
7	55(0)	0(-1.68)	3000(0)	230	43.33	55.55	1.25	0.01	0.03	115	63.33	42.21	1.52	0.43	0.62
8	130.68 (1.68)	27.5(0)	3000(0)	470	53.33	5.51	15.60	0.63	0.70	230	71.67	75.44	42.80	2.38	3.64
9	55(0)	65.34 (1.68)	3000(0)	400	180	44.65	25.25	0.23	0.29	330	63.33	74.32	36.44	3.26	5.66
10	55(0)	27.5(0)	3000(0)	560	216.67	47.81	62.57	0.86	1.01	340	130	90.29	78.38	3.35	6.00
11	55(0)	27.5(0)	3000(0)	640	178.33	46.43	44.16	0.57	1.13	330	140	89.76	77.75	3.11	5.91
12	55(0)	27.5(0)	3000(0)	480	170	52.59	39.21	0.41	0.93	325	106.67	88.90	78.33	3.60	6.13
13	55(0)	27.5(0)	3000(0)	520	233.33	58.52	43.67	0.16	1.09	365	155	89.59	78.70	3.90	6.64
14	55(0)	27.5(0)	3000(0)	580	208.33	55.33	48.91	0.32	1.05	330	106.67	88.40	78.09	3.36	5.53
15	55(0)	27.5(0)	3000(0)	450	141.67	63.03	44.99	0.69	0.88	310	100	89.88	78.15	3.06	5.56
16	10(-1)	5(-1)	5000(1)	250	73.33	43.61	11.93	0.17	0.13	290	181.67	32.12	10.32	2.22	3.33
17	10(-1)	50(-1)	5000(1)	270	35	13.79	32.20	0.18	0.55	305	160.83	40.05	50.47	2.10	3.30
18	100(1)	5(-1)	5000(1)	470	78.33	32.37	3.93	0.23	0.83	250	161.67	66.60	15.16	1.80	2.72
19	100(1)	50(-1)	5000(1)	520	21.67	34.84	40.23	0.31	1.12	260	132.5	57.26	46.46	1.45	2.36
20	55(0)	27.5(0)	6363.59 (1.68)	450	205	53.10	45.28	0.51	0.60	310	173.33	83.94	77.41	4.06	4.82

Las especies de microalgas, así como cualquier variación en las condiciones de cultivo, en la mayoría de los casos influirán significativamente en las respuestas al experimento. Existen diversos estudios en donde se han comparado microalgas y cianobacterias, encontrándose en los mismos una divergencia de opiniones. En una investigación [98], se compararon dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*) y una cianobacteria (*Arthrospira maxima*) en aguas residuales sin tratar, tratadas y enriquecidas con fertilizantes. Se observaron mejores productividades de biomasa en cultivos en aguas residuales crudas, debido a que en este medio las microalgas consumen tanto nutrientes orgánicos como inorgánicos, suponiendo una ventaja sobre los medios de cultivo autótrofos. Además, se observó un menor crecimiento de cianobacterias en comparación con microalgas en aguas residuales crudas, fenómeno contrario a lo observado en esta investigación, en donde la cianobacteria utilizada, tuvo un alto crecimiento celular y productividades de biomasa. Esto indica que *Leptolyngbya* sp. tiene un elevado potencial de productividad, en comparación con otras cianobacterias. Lo cual se confirma con otra investigación [26], en el norte de la India, en donde se aislaron diez cianobacterias, de las cuales *Leptolyngbya* sp. fue seleccionada por su alta tasa de crecimiento específico, que fue de 0.246 día^{-1} , mientras que en esta investigación las cianobacterias alcanzaron una tasa de crecimiento de 0.56 día^{-1} . Por lo tanto, podemos concluir que esta especie, si la comparamos con otras especies de cianobacterias, es capaz reproducirse a altas velocidades y generar así altas concentraciones celulares, por lo que es una especie apta para su uso en el cultivo en aguas residuales acoplado con la productividad de biomasa.

4.2. Remoción de nutrientes en agua residual sintética

Las microalgas pueden asimilar nitrógeno y fósforo simultáneamente, pero las tasas de consumo de nitrógeno y fósforo varían entre las especies de algas y dependen en gran medida de los niveles de nutrientes [99,9]. Los macronutrientes, en particular el nitrógeno y el fósforo, pueden influir directamente en el crecimiento de las microalgas [71,100]. El nitrógeno es uno de los constituyentes vitales de las algas, que se encuentra en aminoácidos, proteínas, ADN, ARN, enzimas, vitaminas y muchos otros compuestos celulares; este nutriente constituye alrededor del 1% a >10% de la biomasa de algas, variando entre diferentes grupos y especies en particular [101,100]. La asimilación del nitrógeno inorgánico se realiza en forma de nitrato, nitrito y amonio. El nitrógeno amoniacal (N-NH_3) suele ser la fuente de nitrógeno preferida por los microorganismos, ya que es la forma más pequeña de compuestos nitrogenados y la más fácil de asimilar por las algas [90]. El fósforo, por otro lado, es esencial para muchos procesos celulares, como la transferencia de energía, la biosíntesis de ácidos nucleicos, el ADN, la formación de fosfolípidos, el trifosfato de adenosina, para la producción de ATP y NADPH en las reacciones en fase luminosa, los cuales se usan en las reacciones de fase oscura para la producción de compuestos complejos, entre otros [90]. Generalmente constituye menos del 1% de la biomasa de algas y suele ser uno de los factores limitantes del crecimiento más importantes en las algas, ya que tiende a precipitar al unirse fácilmente con otros iones. El aporte de P influye en la composición de la biomasa producida, especialmente en el contenido de lípidos [100].

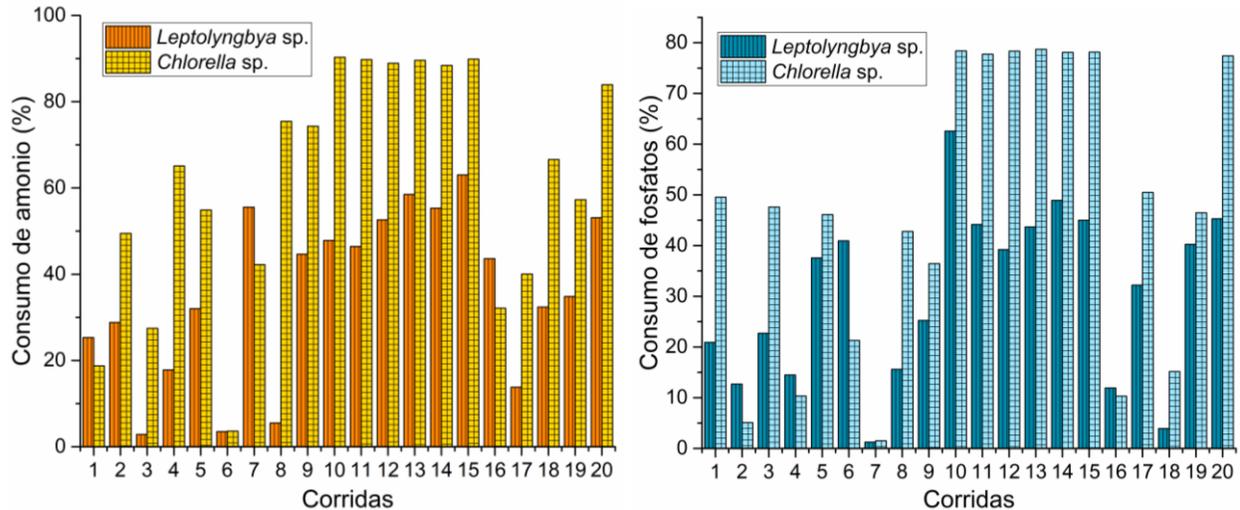


Figura 18. Consumo de nutrientes (%) en agua residual sintética para la cianobacteria *Leptolyngbya sp.* y la microalga *Chlorella sp.*

a) Consumo de amonio b) Consumo de fosfatos

En la Figura 18 (a y b), se puede observar el consumo de amonio y fosfatos (%) alcanzados en los cultivos de ambas algas, los cuales fueron enumerados de acuerdo con la corrida indicada en la Tabla 2. Las remociones de amonio para *Chlorella sp.* (Fig. 18 (a)) varían de 18,75% a 89,88% para tratamientos de aguas residuales sintéticas. Las mayores remociones de amonio se observaron, para aquellos tratamientos con concentraciones medias de amonio y fosfatos 55:27.5, para intensidades de luz de 3000 y 6000 luxes, así como para las corridas 8 y 9, que se observan en la Tabla 2, con concentraciones de amonio:fosfatos de 138,68:27,5 y 55:65,34, respectivamente y a 3000 luxes. Cabe señalar que estos tratamientos también presentaron altas concentraciones celulares. Por otro lado, los porcentajes de remoción de fosfato (Fig. 18 (b)) oscilaron entre 1,52% y 78,38%. La mayor remoción de fosfatos para esos tratamientos, las concentraciones medias de amonio y fosfatos (55 mg L⁻¹ y 27.5 mg L⁻¹, respectivamente), a 3000 y 6000 luxes. Para la cianobacteria *Leptolyngbya sp.* las remociones más altas, tanto para amonio como para fosfatos (Fig. 18), se encuentran en los tratamientos con concentraciones medias de amonio y fosfatos (55 mg L⁻¹ y 27.5 mg L⁻¹, respectivamente), con intensidades de 3000 y 6000 luxes, las remociones fueron de 46.43 % a 63,03% de amonio y de 39,21% a 62,57% de fosfatos.

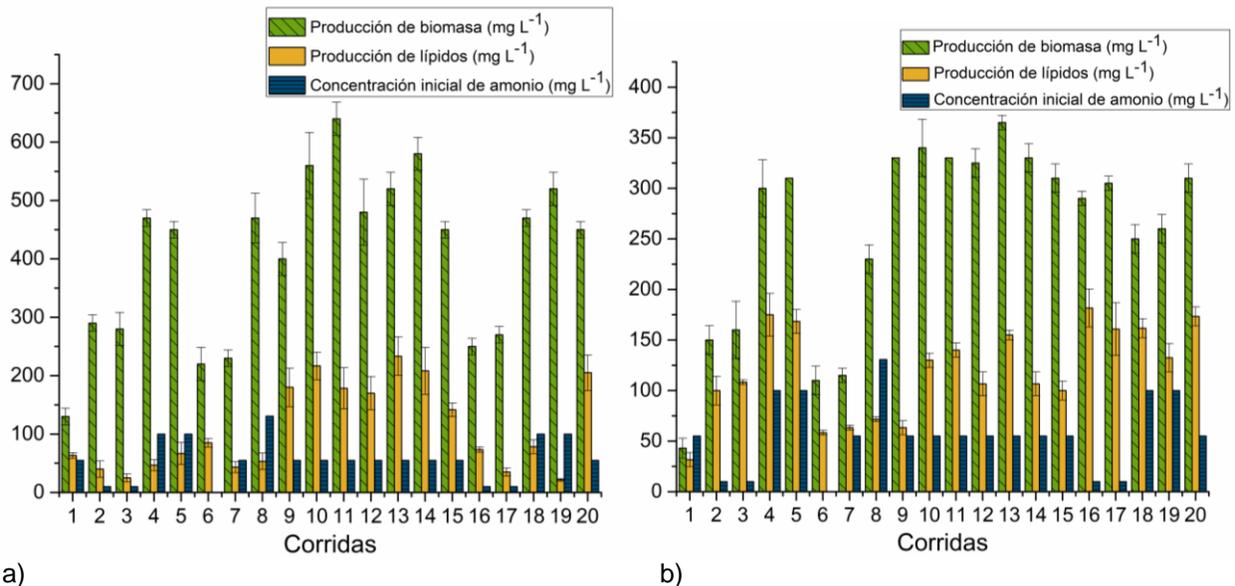
Otros tratamientos con altas remociones de fosfato fueron las corridas 6 y 19 (Tabla 2). Se observan mayores remociones, tanto de amonio como de fosfatos, en los tratamientos inoculados con *Chlorella sp.*, en comparación con el consumo alcanzado por el alga *Leptolyngbya sp.* Estudios con *Chlorella sp.* demuestran una gran capacidad de las microalgas para crecer en aguas residuales con altas remociones de amonio y fosfatos [102,103]. Sin embargo, las cianobacterias respondieron bien a este tipo de medios de cultivo, al reducir significativamente la concentración de contaminantes en los mismos. Existen algunos estudios realizados con cianobacterias con medio de cultivo alternativo [95,104]. Estudios de *Leptolyngbya sp.* en las aguas residuales municipales bajo diversas condiciones de cultivo son escasos. El uso de esta cianobacteria en las aguas residuales municipales podría ser de gran importancia, debido a la gran cantidad de este

contaminante que se genera, pudiendo aprovechar los beneficios de la producción de esta especie.

4.3. Rendimiento de lípidos

En la Fig. 19 se puede observar una gráfica comparativa de la productividad de biomasa, de lípidos y la concentración inicial de amonio en los tratamientos. La mayor concentración de lípidos en *Chlorella* sp. se presentó en los tratamientos con valores de intensidad lumínica alta y baja, a 5000 y 1000 luxes, así como de las corridas 10 a la 16 (Tabla 2). Los mayores rendimientos se observaron en las corridas, 16, 4 y 20 (Tabla 2), con 181.67, 175.00 y 173.33 mg L⁻¹ de lípidos totales, respectivamente. Las mayores productividades de biomasa se observaron en las corridas 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 20. Estos tratamientos corresponden también con altas concentraciones iniciales de amonio (Fig.19 (b)). Con excepción de los tratamientos 16 y 17 (Tabla 2), los cuales presentaron altas concentraciones de biomasa, a pesar de tener una baja cantidad de amonio, observándose además un contraste con los tratamientos 2 y 3 (Tabla 2), mismos que presentan la misma concentración de nutrientes que estos tratamientos, pero una iluminación menor (1000 luxes), lo que nos indicaría que la baja iluminación acoplada a bajas concentraciones de alguno de los nutrientes esenciales del alga, podrían inhibir el crecimiento de esta especie, por lo que, si lo que se desea es obtener altas productividades de biomasa y lípidos, en agua residual con bajas cantidades de nutrientes, sería necesario que la iluminación sea cercana a los 5000 luxes. En el caso del tratamiento de 6000 luxes, la alta cantidad de lípidos se debió al estrés causado por la alta intensidad lumínica, ya que la alta cantidad de luz puede generar estrés en estos microorganismos provocando una mayor acumulación de lípidos [105], esto se puede verificar comparando las concentraciones de lípidos alcanzadas por el tratamiento con la misma concentración de amonio y fosfatos, pero menos iluminación (a 3000 luxes), que son menores. Se observa además una alta productividad de biomasa, muy cercana a estos últimos tratamientos, a pesar de haberse sometido a estrés. En el caso de los tratamientos donde no hubo presencia de amonio ni fosfatos (ensayos 6, 7, 16 y 17 de la Tabla 2), la literatura reporta que la concentración de lípidos puede mejorar en condiciones de estrés, debido a la disminución o eliminación de algunos de los nutrientes esenciales en las algas [106], ya que esta condición provoca la activación de las enzimas de síntesis de ácidos grasos [4]. Algunos de estos medios presentan cantidades significativas de fosfatos lo que pudo haber influido en las altas productividades de lípidos y biomasa. El fósforo puede ser asimilado para la acumulación de lípidos [107,9]. En general, la iluminación influyó en la cantidad de lípidos, ya que, para tratamientos con 5000 luxes, la concentración de lípidos es ligeramente mayor que aquellos con poca iluminación (1000 luxes), comportamiento que se ha presentado en numerosos estudios con microalgas donde el contenido de lípidos totales es directamente proporcional a la intensidad de la luz absorbida en el medio de cultivo [105]. Además, las mayores productividades de biomasa se presentaron en aquellos tratamientos con altas concentraciones de nitrógeno, por lo que una adecuada combinación de estos factores, puede beneficiar la producción de lípidos y biomasa en *Chlorella* sp. La mayor concentración de lípidos se presentó en el tratamiento 16 (Tabla 2), el cual se realizó bajo condiciones de estrés por nutrientes y con una iluminación alta de 5000 luxes, mientras

que las más altas productividad de biomasa se presentaron en los puntos centrales, con concentraciones medias de cada uno de los factores analizados, aunque cabe mencionar que aquellos tratamientos bajo estrés por nutrientes, pero con una alta iluminación, también presentaron altas productividades de biomasa y lípidos, por lo que la iluminación podría considerarse el factor limitante principal para la microalga.



a) *Leptolyngbya sp.* b) *Chlorella sp.*
 Figura 19. Gráficas comparativas de la productividad de biomasa, de lípidos y la concentración inicial de amonio en los tratamientos.
 a) Microalga *Leptolyngbya sp.* b) Microalga *Chlorella sp.*

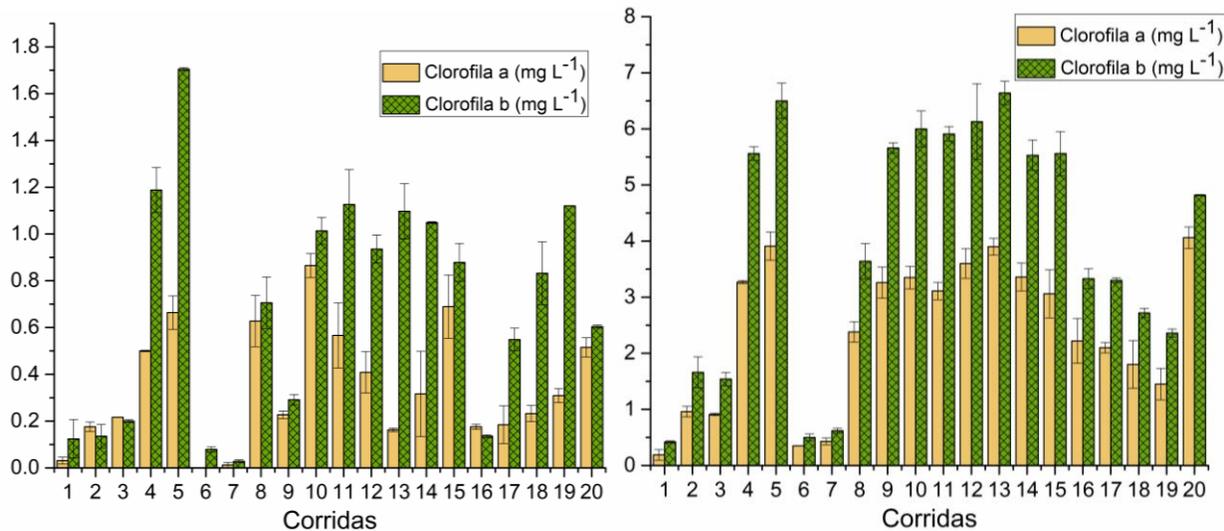
Para la cianobacteria *Leptolyngbya sp.* las mayores concentraciones de lípidos y biomasa se presentaron para los valores medios de amonio, fosfato y luminosidad, con un rendimiento máximo de 233,33 mg L⁻¹ de lípidos totales (Fig. 19 (a)). Cabe señalar que una intensidad lumínica adecuada contribuye a una sobreproducción de lípidos [50]. Además, podemos observar que las mayores productividades de lípidos y biomasa corresponden con una alta concentración inicial de amonio (Fig. 19 (a)). Este fenómeno es bastante similar al presentado por *Chlorella sp.*, sin embargo, la cianobacteria presenta una mayor sensibilidad a la disminución o exceso de iluminación y a las condiciones de estrés, por lo que los tratamientos con concentraciones medias de cada uno de los factores se consideran los más adecuados para el crecimiento de esta especie. En los tratamientos en condiciones heterótrofas tanto para algas como para cianobacterias se observan altos porcentajes de lípidos con respecto a la producción de biomasa, esto podría considerarse un método potencial para el cultivo de estas microalgas, ya que bajo este enfoque se tiene un crecimiento microalgal en menor tiempo, como se observa en la cinética de crecimiento, y, además, es posible alcanzar altas concentraciones de lípidos [108,109]. La cianobacteria *Leptolyngbya sp.* logró mayores productividades de lípidos y biomasa en comparación con *Chlorella sp.*, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, tal como ocurrió en un estudio realizado por Ramesh et al. [92], donde *Leptolyngbya sp.* se aisló de aguas residuales domésticas y se comparó su productividad lipídica con *Chlorella vulgaris*, estos cultivos fueron inducidos a estrés térmico, resultando que las cianobacterias presentaron mejor productividad lipídica en

comparación con las microalgas. Otros estudios basados en *Leptolyngbya* sp. consideran la cepa como una materia prima potencial para el tratamiento simultáneo de aguas residuales y producción de lípidos (para producir biodiésel) [104].

Existen investigaciones en donde las productividades de lípidos y biomasa son diversas. Kim et al. [110], presentan un rendimiento máximo de ácidos grasos de 0.9%, para *Scenedesmus* sp. cultivado en aguas residuales agrícolas (orina de cerdo fermentada), con una productividad lipídica de 1.77 mg L^{-1} , inferior a la obtenida en este estudio. En estudios realizados a través de estrés nutricional se esperan mayores concentraciones de lípidos, pero menor biomasa [111], tal es el caso de Cobos *et al.* [112]. Ellos reportaron para un cultivo libre de nitrógeno, concentraciones de lípidos para *Scenedesmus quadricauda*, alrededor del 14% y productividades de biomasa de aproximadamente 60 mg L^{-1} obteniendo una productividad lipídica aproximada de 8.4 mg L^{-1} de lípidos. Para *Scenedesmus* sp. se obtuvo un rendimiento lipídico de 24.33%, con una productividad de biomasa aproximada de 175 mg L^{-1} , obteniendo finalmente una productividad lipídica de 42.57 mg L^{-1} . La comparativa con estos estudios apunta a que las microalgas analizadas, pueden ser viables para la producción de lípidos al ser cultivadas en agua residual. La productividad de los lípidos varía según la especie y las condiciones a las que están expuestas. Sin embargo, se encuentran similitudes en las productividades entre los diferentes métodos de cultivo estudiados por diversos autores, como son el estrés nutricional, alta biomasa y los resultados obtenidos en este estudio.

4.4. Clorofila

Las microalgas generalmente contienen de 0,5 a 1,0 % de clorofila en base al peso seco [113] [114]. En el caso de la microalga *Chlorella* sp., la mayor concentración de Clorofila a y b se logró en las corridas (Tabla 2) 20, 4, 5, 9 y de 10 a 15 (puntos centrales), esto se puede observar con mayor claridad en la Fig 20 (b). La intensidad de la luz es un factor importante, ya que en altas concentraciones provocan la fotoinhibición celular, lo que se refleja en la cantidad de clorofila producida [115]. Para la microalga *Chlorella* sp., la alta iluminación utilizada en los tratamientos influyó levemente en la concentración de pigmentos, la cual fue relativamente menor en comparación con los tratamientos con las mismas concentraciones de amonio y fosfatos, pero a una iluminación de 3000 luxes.



a) b)
 Figura 20. Concentración de clorofila a y clorofila b en los tratamientos.
 a) Microalga *Leptolyngbya* sp. b) Microalga *Chlorella* sp.

Para la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. las concentraciones más altas de clorofila a, se presentaron en las corridas 5, 8 y de la 10 a la 15 (puntos centrales) de la Tabla 2 (Fig. 20 (a)). Mientras que para la clorofila b se presentaron las corridas 4, 5, de la 10 a la 15 (puntos centrales) y la corrida 19 (Fig. 20 (a)). Se puede observar que, en la mayoría de los tratamientos, la cantidad de luz tuvo una influencia importante en la concentración de pigmentos, otros estudios con *Arthronema africanum* y *Aphanizomenon flos-aque* apoyan la suposición de que la mayoría de las cianobacterias de agua dulce son altamente sensibles a altas intensidades de luz, es decir, las cianobacterias prefieren intensidades de luz bajas debido a su baja tasa de energía específica de mantenimiento y composición de pigmentos [96,116].

Además, la microalga verde *Chlorella* sp. es popular como fuente primaria de producción de clorofila, también se le llama la “esmeralda verde” por su alto contenido de clorofila, puede alcanzar hasta el 7% del contenido de biomasa en peso seco, además, tiene orgánulos especiales (cloroplastos) que aumentan la capacidad de absorción de energía luminosa, lo que explica la mayor concentración de este pigmento en esta microalga, en comparación con *Leptolyngbya* sp. [9,113]. El nitrógeno es una fuente importante para la producción de pigmentos, ya que se ha demostrado que la falta de este elemento conduce a una disminución del rendimiento fotosintético [117]. Por lo tanto, se puede observar que la mayor concentración de pigmentos se presentó para los tratamientos con media y alta concentración de amonio en los medios. Se observa que las altas concentraciones de clorofila también se corresponden con altas concentraciones de biomasa en los tratamientos.

4.5. Análisis del modelo de superficie de respuesta

Se consideraron el amonio, los fosfatos y la iluminación para realizar la optimización del proceso, utilizando un enfoque DCC (Diseño Compuesto Central), para la MSR

(Metodología de Superficie de Respuesta). La matriz de diseño completa de las condiciones experimentales establecidas, así como los resultados observados, es decir, el consumo de amonio y fosfatos de *Chlorella* sp. y *Leptolyngbya* sp. se enumeran en la Tabla 2 con la respectiva biomasa, rendimiento de lípidos y concentración de rendimiento de lípidos de clorofila a y clorofila b. Al aplicar el análisis de regresión múltiple de los datos experimentales listados en la Tabla 2, se obtuvieron las siguientes ecuaciones polinómicas de segundo orden para explicar el consumo de amonio y fosfatos de *Chlorella* sp. en forma no codificada.

$$\text{Remoción de amonio (\%)} = -6.9 + 1.268A + 1.006B + 0.02068C - 0.00852A^2 - 0.02109B^2 - 0.000003C^2 - 0.00069AB + 0.000013AC + 0.000086BC \quad (9)$$

$$\text{Remoción de fosfatos (\%)} = -30.49 + 1.095A + 3.273B + 0.01292C - 0.008768A^2 - 0.04424B^2 - 0.000002C^2 - 0.00191AB - 0.000004AC - 0.000019BC \quad (10)$$

Dónde, A = Amonio, B = Fosfatos y C = Iluminación.

Mientras que las ecuaciones polinómicas de segundo orden, obtenidas para explicar el consumo de amonio y fosfatos en forma no codificada de la microalga *Leptolyngbya* sp. fueron los siguientes:

$$\text{Remoción de amonio (\%)} = 9.33 + 0.8472A - 0.288B + 0.01417C - 0.009070A^2 - 0.00438B^2 - 0.000002C^2 + 0.00866AB - 0.000011AC - 0.000042BC \quad (11)$$

$$\text{Remoción de fosfatos (\%)} = -0.58 + 0.322A + 1.325B + 0.00907C - 0.003515A^2 - 0.02440B^2 - 0.000001C^2 + 0.00389AB - 0.000027AC + 0.000073BC \quad (12)$$

Dónde, A = Amonio, B = Fosfatos y C = Iluminación.

La competencia de los modelos se verificó mediante ANOVA (Análisis De La Varianza), como se muestra en las Tablas 3, 4, 5 y 6. El modelo para la remoción de amonio y fosfatos, ambos para *Chlorella* sp. así como para *Leptolyngbya* sp. tiene un valor de $p < 0.05$, lo que sugiere que el modelo fue altamente significativo tanto para el consumo de amonio como para el de fosfato. La bondad del ajuste del modelo se verificó mediante el coeficiente de determinación (R^2) para el consumo de amonio y fosfatos que fue de 0.83 y 0.95 para *Chlorella* sp. y 0,92 y 0,82 para *Leptolyngbya* sp., respectivamente. Lo que sugiere que los modelos polinómicos cuadráticos (Ec. (9, 10, 11 y 12)) fueron adecuados para revelar la relación mutua de las variables. Para este estudio, el 82.67% y el 95.52% de la variación en *Chlorella* sp. y el 92.16% y 82.11% de la variación en *Leptolyngbya* sp., para el consumo de amonio y fosfatos respectivamente, fue explicada por el modelo.

Tabla 3. ANOVA de *Chlorella* sp. para el consumo de amonio.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	9	23150.9	2572.32	15.90	0.000
Lineal	3	8620.6	2873.54	17.76	0.000
Amonio	1	6818.7	6818.71	42.15	0.000
Fosfatos	1	61.4	61.37	0.38	0.543
Iluminación	1	1740.5	1740.53	10.76	0.003
Cuadrado	3	14259.1	4753.04	29.38	0.000
Amonio*Amonio	1	8583.0	8582.96	53.06	0.000
Fosfatos*Fosfatos	1	3285.3	3285.27	20.31	0.000
Iluminación*Iluminación	1	5012.4	5012.38	30.99	0.000
Interacción de 2 factores	3	271.2	90.39	0.56	0.646
Amonio*Fosfatos	1	7.9	7.90	0.05	0.827
Amonio*Iluminación	1	22.3	22.30	0.14	0.713
Fosfatos*Iluminación	1	241.0	240.96	1.49	0.232
Error	30	4853.0	161.77		
Falta de ajuste	5	4644.8	928.96	111.54	0.000
Error puro	25	208.2	8.33		
Total	39	28003.9			

Tabla 4. ANOVA de *Chlorella* sp. para el consumo de fosfatos.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	9	28961.1	3217.9	71.12	0.000
Lineal	3	7136.1	2378.7	52.57	0.000
Amonio	1	240.2	240.2	5.31	0.028
Fosfatos	1	6368.4	6368.4	140.75	0.000
Iluminación	1	527.5	527.5	11.66	0.002
Cuadrado	3	21751.8	7250.6	160.24	0.000
Amonio*Amonio	1	9086.8	9086.8	200.82	0.000
Fosfatos*Fosfatos	1	14460.3	14460.3	319.58	0.000
Iluminación*Iluminación	1	1277.0	1277.0	28.22	0.000
Interacción de 2 factores	3	73.1	24.4	0.54	0.659
Amonio*Fosfatos	1	59.7	59.7	1.32	0.260
Amonio*Iluminación	1	2.2	2.2	0.05	0.827
Fosfatos*Iluminación	1	11.3	11.3	0.25	0.621
Error	30	1357.4	45.2		
Falta de ajuste	5	1279.7	255.9	82.31	0.000
Error puro	25	77.7	3.1		
Total	39	30318.5			

Tabla 5. ANOVA de *Leptolyngbya* sp. para el consumo de amonio.

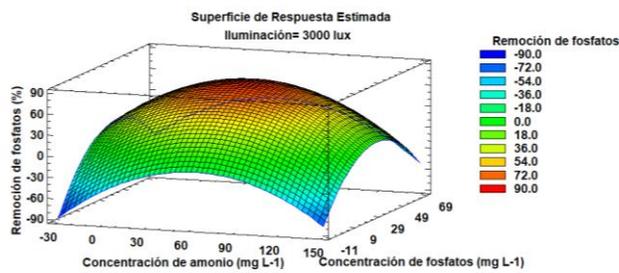
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	9	13336.7	1481.85	39.16	0.000
Lineal	3	1783.6	594.54	15.71	0.000
Amonio	1	162.8	162.76	4.30	0.047
Fosfatos	1	446.5	446.46	11.80	0.002
Iluminación	1	1174.4	1174.42	31.04	0.000
Cuadrado	3	10249.3	3416.44	90.29	0.000
Amonio*Amonio	1	9722.5	9722.48	256.96	0.000
Fosfatos*Fosfatos	1	141.6	141.58	3.74	0.063
Iluminación*Iluminación	1	1064.7	1064.73	28.14	0.000
Interacción de 2 factores	3	1303.7	434.58	11.49	0.000
Amonio*Fosfatos	1	1229.5	1229.48	32.49	0.000
Amonio*Iluminación	1	16.0	16.00	0.42	0.521
Fosfatos*Iluminación	1	58.3	58.26	1.54	0.224
Error	30	1135.1	37.84		
Falta de ajuste	5	284.8	56.96	1.67	0.177
Error puro	25	850.3	34.01		
Total	39	14471.8			

Tabla 6. ANOVA de *Leptolyngbya* sp. para el consumo de fosfatos.

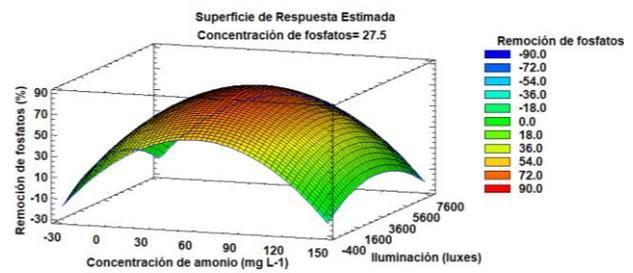
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	9	9026.7	1002.97	15.30	0.000
Lineal	3	2733.3	911.10	13.90	0.000
Amonio	1	78.4	78.40	1.20	0.283
Fosfatos	1	2372.8	2372.83	36.19	0.000
Iluminación	1	282.1	282.07	4.30	0.047
Cuadrado	3	5782.6	1927.52	29.40	0.000
Amonio*Amonio	1	1460.4	1460.44	22.27	0.000
Fosfatos*Fosfatos	1	4398.8	4398.82	67.09	0.000
Iluminación*Iluminación	1	817.4	817.40	12.47	0.001
Interacción de 2 factores	3	510.9	170.28	2.60	0.071
Amonio*Fosfatos	1	248.0	248.01	3.78	0.061
Amonio*Iluminación	1	92.4	92.38	1.41	0.245
Fosfatos*Iluminación	1	170.5	170.46	2.60	0.117
Error	30	1967.1	65.57		
Falta de ajuste	5	1082.5	216.49	6.12	0.001
Error puro	25	884.6	35.38		
Total	39	10993.8			

El diagrama de superficie representa la función relación entre las respuestas (consumo de amonio y consumo de fosfatos) y las variables continuas (concentración de amonio, concentración de fosfatos e iluminación), para cada una de las especies. El gráfico de superficie de respuesta ayuda a visualizar cómo reaccionó el consumo de amonio y de fosfatos a los cambios en las variables y se utilizó para predecir la interacción entre las variables y dichas respuestas. La gráfica de superficie de respuesta se construyó trazando cada una de las respuestas (consumo de amonio y de fosfatos) en el eje Z contra dos variables cualesquiera mientras se mantiene otra variable en su nivel óptimo como se muestra en la Fig. 21 y 22 (a – f).

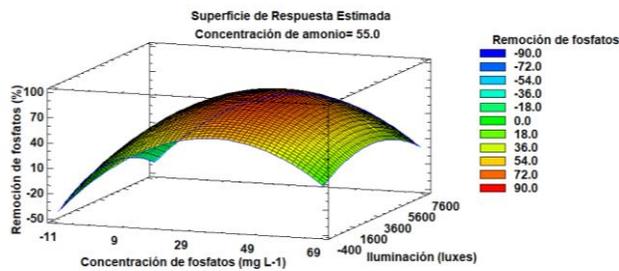
En el caso de *Chlorella* sp., todos los gráficos de superficie (Fig. 21 (a-f)) mostraron que, a medida que aumentaban los niveles de las variables de proceso, el rendimiento de lípidos también aumentaba hasta cierto nivel, y todas las variables mostraron un efecto no lineal sobre el rendimiento de lípidos. Como se muestra en la Fig. 21 (a) hubo un fuerte aumento en el consumo de fosfato con un aumento en la concentración de amonio de 0 a 90,0 mg L⁻¹ y un consumo máximo de fosfato cuando la concentración de amonio estuvo cerca de 60,00 mg L⁻¹, mientras que la concentración de fosfato con la que se alcanzó el mayor consumo de fosfato fue de 35,0 mg L⁻¹. De igual manera en la Fig. 21 (b), el amonio mostró un efecto significativo en el consumo de fosfato y alcanzó un máximo cuando su concentración estuvo alrededor de 58.0 mg L⁻¹, mientras que la iluminación alcanzó el consumo máximo a 3600 luxes. La Fig. 21 (c) muestra la interacción entre la iluminación y la concentración de fosfato, donde se logran remociones de fosfato de hasta el 90%, con una concentración de fosfato de alrededor de 36,0 mg L⁻¹ y una iluminación de 3600 luxes. En la Fig. 21 (d), el aumento en la concentración de amonio y fosfatos provocó un aumento en el consumo de amonio, alcanzando un máximo cuando la concentración de amonio fue de 76,0 mg L⁻¹ y la concentración de fosfatos fue de 30,0 mg L⁻¹, observándose una disminución de este, al aumentar estas concentraciones. De igual manera en la Fig. 21 (e), la máxima remoción de amonio de alrededor del 90% se alcanzó cuando la iluminación fue de 3600 luxes y una concentración de amonio de 75.0 mg L⁻¹, observándose una disminución de esta remoción en los extremos de la gráfica. La concentración de fosfatos y la iluminación, relacionada con el consumo de amonio Fig. 21 (f), presentaron los mayores porcentajes de remoción de este compuesto con 30.0 mg L⁻¹ de fosfatos y 3600 luxes, notándose de igual forma disminuciones en la concentración de amonio en los puntos extremos. Las interacciones entre todas las variables fueron significativas ($p < 0.05$) como se muestra en la Fig. 21 (a-f).



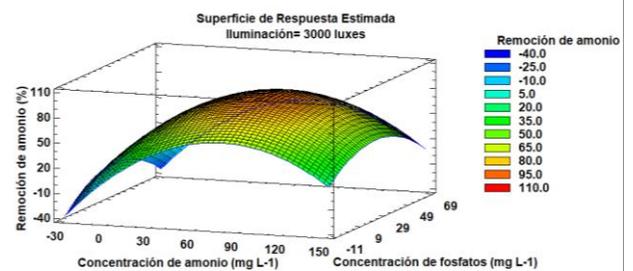
a)



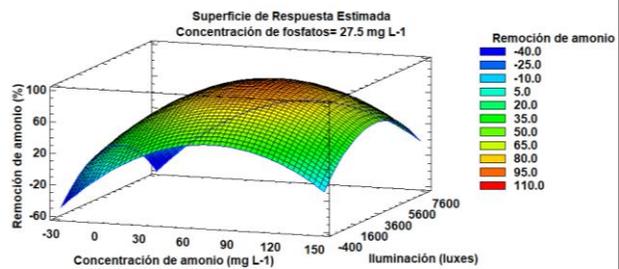
b)



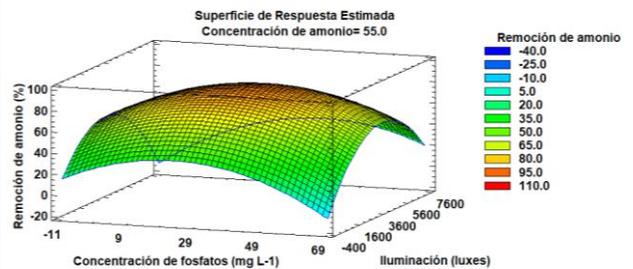
c)



d)



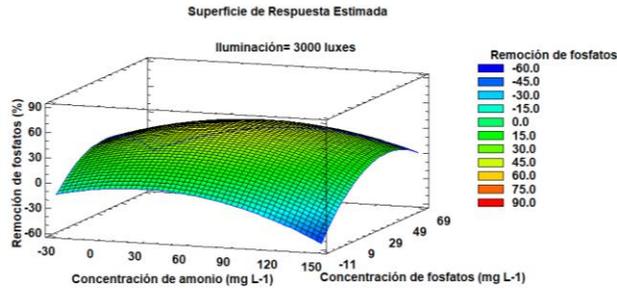
e)



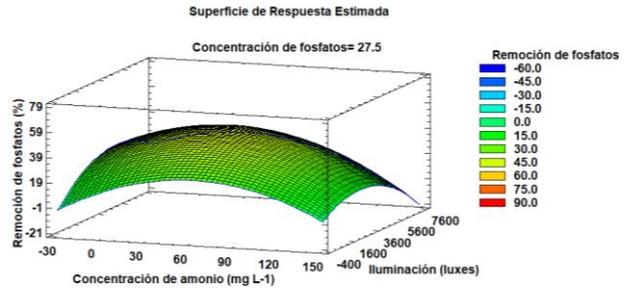
f)

Figura 21. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para *Chlorella* sp. Muestran los efectos interactivos de a) NH_4^+ y PO_4^{3-} , b) NH_4^+ e Iluminación y c) PO_4^{3-} e Iluminación sobre la remoción de fosfatos de *Chlorella* sp. y d) NH_4^+ y PO_4^{3-} , e) NH_4^+ e Iluminación y f) PO_4^{3-} e Iluminación sobre la remoción de amonio de *Chlorella* sp. El tercer factor, en todos los casos se mantuvo en el nivel medio (NH_4^+ : 50 mg L⁻¹, PO_4^{3-} : 27.5 mg L⁻¹, Iluminación: 3000 luxes).

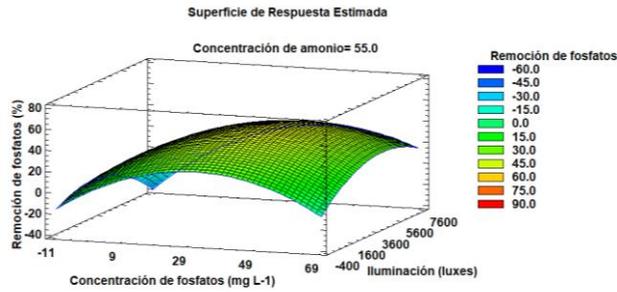
Para *Leptolyngbya* sp., los gráficos de superficie de respuesta mostraron puntos máximos más dispersos que para *Chlorella* sp., aunque el comportamiento fue similar al reportado por las microalgas, mientras que los niveles de las variables de proceso aumentaron, el consumo de amonio y fosfatos también aumentó a cierto nivel. En la Fig. 22 (a), la remoción de fosfatos interactúa con la concentración inicial de amonio y fosfatos, y se puede observar que el consumo máximo de este compuesto se alcanzó a una concentración media de amonio de 50.0 mg L⁻¹ y a una concentración alta concentración de fosfatos de 40,0 mg L⁻¹. De igual forma, en la Fig. 22 (b) se observa que el amonio y la iluminación alcanzan la máxima remoción de fosfato a concentraciones de aproximadamente 50.0 mg L⁻¹ de amonio y 4000 luxes, reduciendo el consumo en puntos extremos. La Fig. 22 (c) muestra el gráfico de superficie para la iluminación y fosfatos, donde se observa un pico máximo de remoción de fosfatos con 37.0 mg L⁻¹ de fosfatos y una iluminación relativamente alta de 4000 luxes. La remoción de amonio y su relación con las variables independientes establecidas se puede observar en la Fig. 13 (d, e y f), donde la interacción del amonio con el fosfato se muestra en la Fig. 22 (d), y alcanzó sus consumos máximos de amonio a una concentración de amonio de 40,0 mg L⁻¹, mientras que la concentración de fosfato presentó un efecto lineal sobre el consumo de amonio, observándose una disminución en la remoción con el aumento de su concentración, mientras que, se observa un efecto contrario con el aumento de esta remoción del compuesto al disminuir la cantidad de fosfatos. En la Fig. 22 (e) se puede observar un efecto significativo de la concentración de amonio y la iluminación sobre la remoción de amonio, el pico máximo de consumo se presentó en 50.0 mg L⁻¹ de amonio y 4000-4500 luxes. En la Fig. 22 (f), el consumo de amonio alcanza 50,0-65,0% a 4500 luxes, mientras que disminuye a una concentración alta de fosfato de 65,0 mg L⁻¹ y aumenta con una concentración baja de fosfato de 0,0-10,0 mg L⁻¹, donde se encuentra la región con mayor remoción de este compuesto.



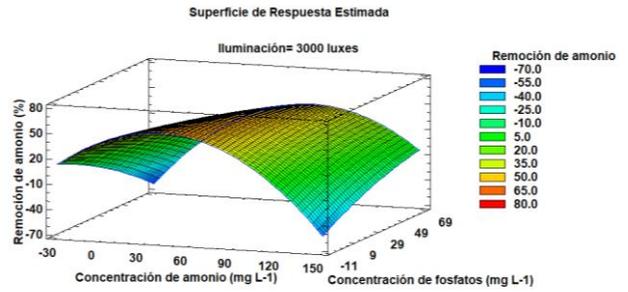
a)



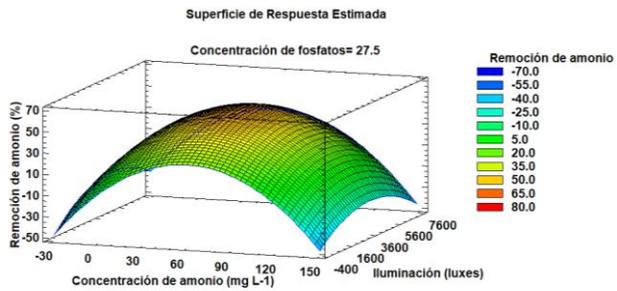
b)



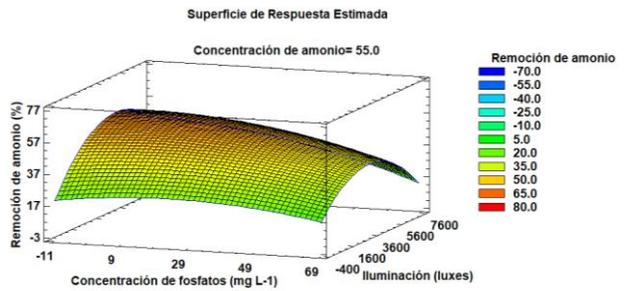
c)



d)



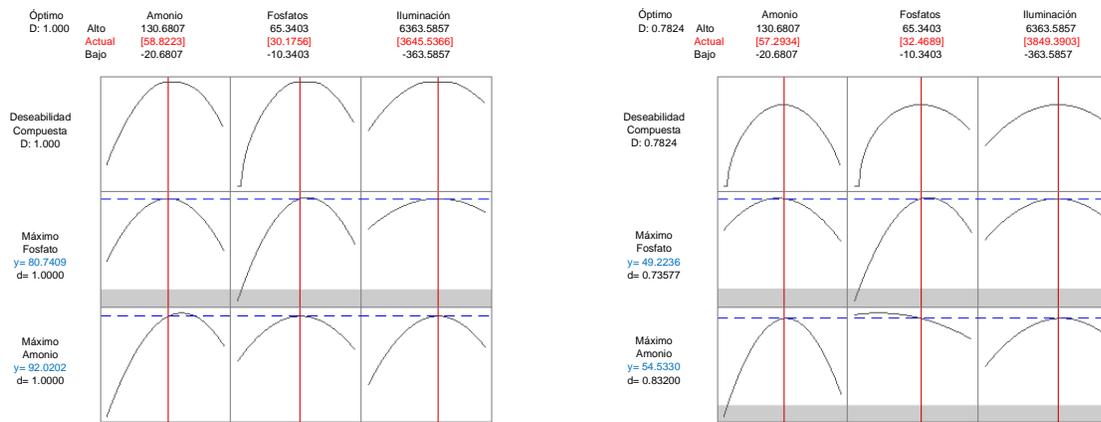
e)



f)

Figura 22. Gráficos de superficie de respuesta tridimensional para *Leptolyngbya* sp. Muestran los efectos interactivos de a) NH_4^+ y PO_4^{3-} , b) NH_4^+ e Iluminación y c) PO_4^{3-} e Iluminación sobre la remoción de fosfatos de *Leptolyngbya* sp. y d) NH_4^+ y PO_4^{3-} , e) NH_4^+ e Iluminación y f) PO_4^{3-} e Iluminación sobre la remoción de amonio de *Leptolyngbya* sp. El tercer factor, en todos los casos se mantuvo en el nivel medio (NH_4^+ : 50 mg L⁻¹, PO_4^{3-} : 27.5 mg L⁻¹, Iluminación: 3000 luxes).

De acuerdo con los resultados obtenidos y las ecuaciones de regresión (Ec. (7,8,9 y 10)), los modelos predijeron el consumo máximo de amonio y fosfatos para *Chlorella* sp., de 92.02% y 80.74%, respectivamente, en la concentración de 58.82 mg L⁻¹ de amonio, 30.17 mg L⁻¹ de fosfatos y 3645.54 luxes de iluminación (Fig. 23 (a)); mientras que para *Leptolyngbya* sp. se pronosticó un consumo máximo de amonio y fosfatos de 54.53% y 49.22%, en las concentraciones de 57.29 mg L⁻¹ de amonio, 32.47 mg L⁻¹ de fosfatos y 3849.39 luxes de iluminación (Fig. 23 (b)) [26].



a) Resultados para *Chlorella* sp. b) Resultados para *Leptolyngbya* sp.
 Figura 23. El máximo consumo previsto de amonio y fosfatos (mg L⁻¹) y el valor optimizado de las variables importantes: NH_4^+ (mg L⁻¹), PO_4^{-3} (mg L⁻¹) and iluminación (luxes).

4.6. Perfil de ácidos grasos y conversión a FAME

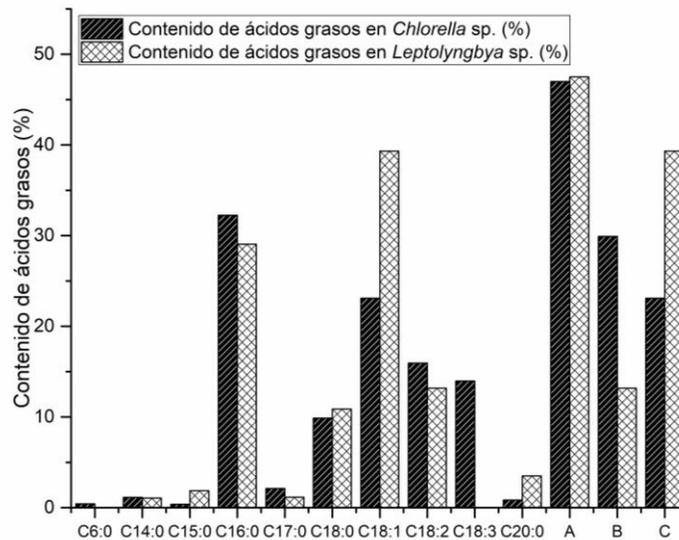


Figura 24. Composición de ácidos grasos de *Chlorella* sp y *Leptolyngbya* sp. A=SFA (Ácidos grasos saturados), B= PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados) y C= MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados).

La microalga y la cianobacteria fueron cultivadas en el medio optimizado para conocer la composición de ácidos grasos y evaluar el medio óptimo en términos de calidad lipídica para la producción de biodiésel. Los ácidos grasos dominantes de la microalga *Chlorella*

sp. cultivada en el medio optimizado de ARS (Fig. 24), incluidos el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido alfa-linolénico (C18:2) y ácido linoleico (C18:3), representando aproximadamente el 95,12% para *Chlorella* sp. El ácido palmítico es el ácido graso con mayor abundancia (32.24%), seguido del ácido oleico (23.10%), ácido alfa-linolénico (15.94%) y ácido esteárico (9.88%). Por otro lado, los ácidos grasos dominantes de la microalga *Leptolyngbya* sp. también cultivados en el medio optimizado de ARS (Fig. 24), fueron el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido alfa-linoleico (C18: 2), con alrededor del 92.43% de abundancia; el ácido graso con mayor abundancia fue el ácido oleico (39.32%), seguido del ácido palmítico (29.06%), ácido alfa-linoleico (13.18%) y ácido esteárico (10.87%). En general, los ácidos grasos que se requieren para la producción de biodiésel consisten principalmente en 16 a 18 átomos de carbono, lo que indica que tanto *Chlorella* sp. como *Leptolyngbya* sp. tienen un alto potencial de producción de biodiésel, debido al mayor porcentaje de ácidos grasos con esta longitud de cadenas carbonatadas [26]. Otro factor esencial para controlar las propiedades FAME es el tipo de ácido graso utilizado: ácidos grasos saturados (SFAs), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [118]. Se observa una mayor concentración de SFAs y MUFAs para ambas especies, en comparación con la concentración de PUFAs. (Fig. 24), por lo tanto, el biodiésel obtenido a partir de estas microalgas podría tener una mejor estabilidad oxidativa durante el almacenamiento [104]. Además, la alta concentración de ácido oleico (MUFA), junto con el ácido palmítico (SFA), tanto en *Leptolyngbya* sp. como en *Chlorella* sp., respalda las propiedades del biodiésel de calidad [92,26]. El ácido oleico, presente en mayor proporción en *Leptolyngbya* sp., favorece el equilibrio entre la estabilidad oxidativa y las propiedades a baja temperatura que mejoran la calidad del biodiésel [104]. Mientras que la presencia de ácido linoleico en *Chlorella* sp. reduce la autooxidación del biodiésel [26]. Sin embargo, *Leptolyngbya* sp., tiene una ligera ventaja sobre *Chlorella* sp., ya que acumuló una gran cantidad de SFAs y ácido oleico, lo cual es deseable para la estabilidad y las características vitales del biodiésel [118].

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

Usando la metodología de superficie de respuesta (MSR), se pudo predecir con éxito el consumo de amonio y fosfatos con la variación en la concentración de iones de amonio y fosfato y la densidad de la luz. De acuerdo con el análisis estadístico se observó que el nivel óptimo de los factores para el consumo máximo de amonio y fosfatos para *Chlorella* sp., fueron 58.82 mg L⁻¹ de amonio, 30.17 mg L⁻¹ de fosfatos y 3645.54 luxes de iluminación; mientras que para *Leptolyngbya* sp. fueron 57,29 mg L⁻¹, amonio, 32,47 mg L⁻¹, fosfatos y 3849,39 luxes de iluminación. *Leptolyngbya* sp. mostró un mejor crecimiento en las aguas residuales sintéticas con mayor contenido de biomasa y lípidos que la clorofita, mientras que *Chlorella* sp. presentó un mayor consumo tanto de amonio como de fosfatos y una mayor concentración de clorofila a y b. A pesar de esto, las dos microalgas mostraron una reducción en los nutrientes sintéticos de las aguas residuales, lo que indica un buen potencial en el tratamiento de aguas residuales. La microalga verde *Chlorella* sp. tuvo una mayor producción de biomasa a una mayor intensidad de luz, mientras que la cianobacteria mostró un mejor crecimiento en los tratamientos con altas concentraciones de amonio. Por otro lado, ambas microalgas obtuvieron concentraciones FAME favorables, aunque *Leptolyngbya* sp. presentó una ligera ventaja al acumular altas cantidades de SFAs y ácido oleico, los cuales son aptos para la estabilidad y características importantes del biodiésel. Este estudio podría proporcionar información suficiente para aplicar las dos microalgas en el tratamiento de aguas residuales municipales con producción simultánea de biomasa, biodiésel y recuperación de nutrientes.

Realizar una mayor cantidad de pruebas para el cultivo heterótrofo podría ser interesante para la producción de microalgas. Se demostró que la acumulación de lípidos en este tipo de cultivo es alta. Se elimina la iluminación, lo que disminuye los costos de producción. Se puede lograr generar biodiésel económicamente más competitivo. El cultivo de alta biomasa con exceso de nutrientes tuvo una buena respuesta, por lo que sería interesante utilizar agua residual real para observar el comportamiento del alga bajo condiciones de alto estrés en un medio contaminado de manera física, química y biológica, realizando pruebas que permitan observar su comportamiento preparando el agua residual de diversas maneras. Además, puede ser interesante realizar pruebas para conocer la acumulación en estas especies de otros productos de alto valor, como son los carbohidratos y proteínas, con el fin de conocer los diversos usos que se le puede dar a estas microalgas de acuerdo con el medio de cultivo utilizado, para de esta manera lograr una producción tipo biorrefinería, y disminuir los costos de esta producción. Finalmente, escalar los cultivos a biorreactores escala piloto sería adecuado para realizar pruebas, para lograr en un futuro una producción en masa de las microalgas y los productos de alto valor que se generen.

En esta investigación se logró optimizar la concentración de amonio, fosfatos y luminosidad para el cultivo comparativo de ambas especies de microalgas en el agua residual sintética, con el fin de conocer el consumo de esos nutrientes a diferentes intensidades de luz y su influencia sobre las productividades de biomasa y lípidos. Debido a la naturaleza del diseño experimental fue posible conocer el comportamiento de la

microalga bajo diferentes condiciones de cultivo, los resultados podrían ser de gran relevancia ya que, tal como se presenta en una investigación realizada por Orantes et al. [119], de esta manera se pueden tomar mejores decisiones cuando se establecen condiciones de cultivo a mayor escala.

Entre los productos alcanzados a lo largo de este trabajo se encuentran diversos congresos internacionales y cursos, los cuales se enlistan en el Anexo 2.

Referencias bibliográficas

- [1] French Institute of Petroleum, «Petroleum reserves: evolutionary and techno-economic data,» French Institute of Petroleum, 2005.
- [2] S. Gupta, S. B. Pawar y Pandey R.A., «Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries,» *Science of the Total Environment*, vol. 687, pp. 1107-1126, 2019.
- [3] IEO, «Energy Information Administration,» IEO. International Energy Outlook, U.S., 2017.
- [4] M. Sacristán de Alva, V. M. Luna Pabello, M. T. Orta Ledesma y M. J. Cruz Gómez, «Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes,» *Algal Research*, pp. 97-103, 2018.
- [5] Y. Sánchez Roque, Y. Pérez Luna, J. Moreira Acosta, N. Farrera Vázquez, J. Sebastian y R. Berrones Hernández, «OPTIMIZATION FOR THE PRODUCTION OF *Verrucodesmus verrucosus* BIOMASS THROUGH CROPS IN AUTOTROPHIC AND MIXOTROPHIC CONDITIONS WITH POTENTIAL FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL,» *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 19, pp. 133-146, 2020.
- [6] A. Rosales Quintero, R. Meza Gordillo , S. Enciso Saenz y H. Castañón González , «Efecto del fotoperiodo y privación de nutrientes en la producción de lípidos, clorofila y proteína en la microalga *Chlorella vulgaris*,» *Academia Journals* , vol. 10, nº 4, pp. 2087-2092, 2018.
- [7] A. Shahid, S. Malik, H. Zhu, J. Xu , M. Zohaib Nawaz, S. Nawaz, M. Asraful Alam y M. Aamer Mehmood, «Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review,» *Science of the Total Environment*, 2019.
- [8] A. Guldhe, S. Kumari, L. Ramanna, P. Ramsundar, P. Singh, I. Rawat y F. Bux, «Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation,» *Journal of Environmental Management*, vol. 203, pp. 299-315, 2017.
- [9] H. Fan , K. Wang, C. Wang, F. Yu, X. He, J. Ma y X. Li, «A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes,» *Environmental Technology & Innovation*, vol. 19, 2020.
- [10] . T. Aketo, Y. Hoshikawa, D. Nojima, Y. Yabu, Y. Maeda , T. Yoshino, H. Takano y T. Tanaka, «Selection and characterization of microalgae with potential for nutrient removal from municipal wastewater and simultaneous lipid production,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019.
- [11] A. Pandey , S. Srivastava y S. Kumar, «Sequential optimization of essential nutrients addition in simulated dairy effluent for improved *Scenedesmus* sp. ASK22 growth, lipid production and nutrients removal,» *Biomass and Bioenergy* , vol. 128, 2019.
- [12] A. M. Wilches Florez, «Biofuels: ¿are they really friendly with environment?,» *Revista Colombiana de Bioética*, vol. 6, nº 1, pp. 89- 102, 2011.
- [13] M. González E., E. Jurado, S. González E., Ó. Aguirre C., J. Jiménez P. y J. Navar, «Cambio Climático Mundial Origen y Consecuencias,» *Ciencia UANL*, vol. 6, nº 3, pp. 377- 386, 2003.
- [14] W. N. A. Kadir , M. Kee Lam , Y. Uemura, J. W. Lim y K. T. Lee , «Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review,» *Energy Conversion and Management*, vol. 171, pp. 1416-1429, 2018.
- [15] S. Banerjee y S. Ramaswamy, «Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in open raceway ponds,» *Algal Research* , vol. 26, pp. 330-340, 2017.
- [16] Loera Quezada y Olguín, «Las Microalgas Oleaginosas Como Fuente de Biodiesel: Retos y Oportunidades,» *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, vol. 1, nº 1, pp. 91- 116, 2010.

- [17] S. Secretaría de Energía , «Estrategia Nacional de Energía,» Ciudad de México, 2013-2027.
- [18] M. Bello , P. Ranganathan y F. Brennan, «Dynamic modelling of microalgae cultivation process in high rate algal wastewater pond,» *Algal Research*, 2016.
- [19] R. De-Luca, M. Trabuio, M. Barolo y F. Bezzo, «Microalgae growth optimization in open ponds with uncertain weather data,» *Computers and Chemical Engineering*, vol. 117, pp. 410-419, 2018.
- [20] A. L. Ido, M. G. G. de Luna , S. C. Capareda, A. L. Maglinao y H. Nam, «Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasonic-assisted solvent extraction,» *Energy*, 2018.
- [21] F. Saladini, N. Patrizi, F. M. Pulselli, N. Marchettini y S. Bastianoni, «Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 66, pp. 221-227, 2016.
- [22] F. Alam, S. Mobin y H. Chowdhury, «Third Generation Biofuel From Algae,» *Procedia Engineering* , vol. 105, pp. 763- 768, 2015.
- [23] A. J. Kings, R. E. Raj, L. R. Monisha Miriam y M. Adhi Visvanathan, «Cultivation, extraction and optimization of biodiesel production from potential microalgae *Euglena sanguinea* using eco-friendly natural catalyst,» *Energy Conversion and Management*, 2016.
- [24] E. Koutra, C. N. Economou, P. Tsafrafidou y M. Kornaros, «Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates,» *Trends in Biotechnology*, pp. 1-15, 2018.
- [25] J. K. Pittman, A. P. Dean y O. Osundeko, «The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 17-25, 2011.
- [26] O. Nath Tiwari , B. Bhunia, M. Muthuraj, T. K. Bandyopadhyay, D. Ghosh y K. Gopikrishna, «Optimization of process parameters on lipid biosynthesis for sustainable biodiesel production and evaluation of its fuel characteristics,» *Fuel*, vol. 269, 2020.
- [27] J. Silva , C. Alves, S. Pinteus, J. Reboleira, R. Pedrosa y S. Bernardino, «Chlorella,» de *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements*, Portugal , Elsevier, 2019, pp. 187-193.
- [28] O. Nath Tiwari , B. Bhunia, T. K. Bandyopadhyay y G. Oinam, «Strategies for improved induction of lipid in *Leptolyngbya* sp. BTA 287 for biodiesel production,» *Fuel*, vol. 256, 2019.
- [29] A. P. Singh Yadav, L. Goswami , V. Dwivedi y S. Kumar, «Leveraging the biosorption potential of *Leptolyngbya boryana* for Cr (VI) removal from aqueous solution,» *Cleaner Engineering and Technology* , vol. 4, 2021.
- [30] J. Singh, R. Tripathi y I. Shekhar Thakur, «Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO₂ and biodiesel production,» *Bioresource Technology*, vol. 166, pp. 345-352, 2014.
- [31] H. Nakamori, T. Yatabe, K.-S. Yoon y S. Ogo, «Purification and characterization of an oxygen-evolving photosystem II from *Leptolyngbya* sp. strain O-77,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 118, pp. 119-124, 2014.
- [32] P. Nigam y A. Singh, «A production of liquid biofuels from renewable resources,» *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 37, nº 1, pp. 52-68, 2011.
- [33] L. Zhu, Y. K. Nugroho, S. R. Shakeel, Z. Li, B. Martinkauppi y E. Hiltunen, «Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: What is next?,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 78, pp. 391-400, 2017.
- [34] A. Singh, P. Singh Nigam y J. D. Murphy, «Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels,» *Bioresource Technology*, vol. 102, nº 1, pp. 26-34, 2011.

- [35] A. Richmond, «The microalgae: with reference to mass-cultivation,» de *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, UK, Blackwell Science, 2004, pp. 1-83.
- [36] I. A. Levine y J. Fleurence, «Biology of microalgae,» de *Microalgae in Health and Disease Prevention*, United States, Academic Press, 2018, pp. 23-59.
- [37] K. Heimann y R. Huerlimann, «Microalgal classification: major classes and genera of commercial microalgal species,» de *Handbook of marine microalgae*, Australia, Elsevier, 2015, pp. 25-41.
- [38] A. Richmond y H. Qiang , «The microalgal cell with reference to mass culture,» de *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, UK, Wiley Blackwell, 2013, pp. 1-146.
- [39] F. Camacho Rubio, F. García Camacho, J. M. Fernández Sevilla, Y. Chisti y E. Molina Grima , «A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, nº 4, pp. 459-473, 2003.
- [40] A. Richmond, «Photosynthesis in Microalgae,» de *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Reino Unido, Blackwell, 2004, pp. 20-39.
- [41] K. K. Vasumathi, M. Premalatha y P. Subramanian, «Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, pp. 5443-5450, 2012.
- [42] G. Torzillo y A. Vonshak, «Environmental stress physiology with reference to mass cultures,» de *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*, UK, Wiley Blackwell, 2013, pp. 90-113.
- [43] V. E. Villafañe, M. A. Marcoval y E. W. Helbling , «Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): temporal variability and solar UVR effects,» *Marine Ecology Progress* , vol. 284, pp. 23-34, 2004.
- [44] M. Rizwan , G. Mujtaba, S. A. Memon, K. Lee y N. Rashid, «Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 92, pp. 394-404, 2018.
- [45] D. Nagarajan, S. Varjani, D.-J. Lee y J.-S. Chang, «Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae- Nutritive value and techno- functional components,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 150, pp. 1-21, 2021.
- [46] T. M. Mata, A. A. Martins y N. S. Caetano, «Microalgae for biodiesel production and other applications: A review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 217-232, 2010.
- [47] F. M. Santos y J. C. M. Pires , «Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char,» *Bioresource Technology*, pp. 1-26, 2018.
- [48] L. Brennan y P. Owende, «Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 557-577, 2010.
- [49] J. Komárek, H. Kling y J. Komárková, «Filamentous Cyanobacteria,» de *Freshwater Algae of North America*, 2003, pp. 117-196.
- [50] L. D. Zhu, Z. H. Li y E. Hiltunen, «Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock,» *Hindawi*, 2016.
- [51] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert y A. Darzins, «Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances,» *The Plant Journal*, nº 54, pp. 621-639, 2008.

- [52] C.-Y. Chen, K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee y J.-S. Chang, «Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 71-81, 2011.
- [53] Cobos, «Biotechnological potential for sustainable biodiesel production of oleaginous microalgae isolated from Itaya river, Loreto, Peru,» *Ecología Aplicada*, vol. 13, nº 2, pp. 169- 175, 2014.
- [54] Y. Chisti, «Biodiesel for Microalgae,» *Biotechnology Advances*, vol. 25, pp. 294- 306, 2007.
- [55] F. Alam, S. Mobin y H. Chowdhury, «Third generation biofuel from Algae,» *Procedia Engineering*, vol. 105, pp. 763-768, 2015.
- [56] C. Tejada Tovar , L. Tejada Benítez , Á. Villabona Ortíz y L. Monroy Rodríguez , «Obtención de biodiesel a partir de distintos tipos de grasa residual de origen animal,» *Revista Luna Azul*, nº 36, pp. 10-25, 2013.
- [57] A. J. Kings, R. E. Raj , L. M. Miriam y M. A. Visvanathan, «Cultivation, extraction and optimization of biodiesel production from potential microalgae *Euglena sanguinea* using eco-friendly catalyst,» *Energy Conversion and Management*, 2016.
- [58] O. Kyung Lee, D. Ho Seong, C. Gyun Lee y E. Yeol Lee, «Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass,» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* , vol. 29, pp. 24-31, 2015.
- [59] J. K. Pittman, A. P. Dean y O. Osundeko , «The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 17-25, 2011.
- [60] K. W. Chew, S. R. Chia , P. L. Show , Y. J. Yap, T. C. Ling y J.-S. Chang , «Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review,» *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, pp. 1-13, 2018.
- [61] A. Bahadar y M. Bilal Khan , «Progress in energy from microalgae: A review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* , nº 27, pp. 128-148, 2013.
- [62] L. Katarzyna, G. Sai y O. Avijeet Singh, «Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: literature review and research needs,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 42, pp. 1418-1427, 2015.
- [63] W. Lu, M. Asraful Alam, S. Liu, J. Xu y R. Parra Saldivar, «Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂ from livestock farms: A review,» *Science of the Total Environment*, 2019.
- [64] A. Belay , «Biology and industrial production of *Arthrospira* (*Spirulina*),» de *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology* , UK, Wiley Blackwell, 2013, pp. 339-358.
- [65] M. Faried , M. Samer , E. Abdelsalam, R. S. Yousef, Y. A. Attia y A. S. Ali, «Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 79, pp. 893-913, 2017.
- [66] A. El-Fatah Abomohra, H. Shang, M. El-Sheekh, H. Eladel, R. Ebaid, S. Wang y Q. Wang, «Night illumination using monochromatic light-emitting diodes for enhanced microalgal growth and biodiesel production,» *Bioresource Technology*, vol. 288, 2019.
- [67] A. Ray , M. Nayak y A. Ghosh, «A review on co-culturing of microalgae: A greener strategy towards sustainable biofuels production,» *Science of the Total Environment*, vol. 802, 2022.
- [68] W. G. Morais Junior , M. Gorgich, P. S. Correa , A. A. Martins, T. M. Mata y N. S. Caetano , «Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing,» *Aquaculture*, 2020.

- [69] A. Yousuf , «Fundamentals of microalgae cultivation,» de *Microalgae Cultivation for Biodiesel Production*, 2020, pp. 1-9.
- [70] D. Nagarajan, D.-J. Lee, C.-Y. Chen y J.-S. Chang, «Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective,» *Bioresource Technology*, 2020.
- [71] L.-L. Zhuang, Y. Dawei, J. Zhang, F.-f. Liu, Y.-H. Wu, T.-Y. Zhang, G.-H. Dao y H.-Y. Hu, «The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 94, pp. 1110-1119, 2018.
- [72] Ación F. G., E. Molina , A. Reis , G. Torzillo, G. C. Zittelli, C. Sepúlveda y J. Masojídek, «Photobioreactors for the production of microalgae,» de *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Woodhead Publishing Series in Energy, 2017, pp. 1-44.
- [73] Y. S. Najjar y A. Abu-Shamleh, «Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review,» *Algal Research*, vol. 51, pp. 1-16, 2020.
- [74] M. Lara Menegazzo y G. Graciano Fonseca , «Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review,» *Renewable and Sustainable Energy*, vol. 107, pp. 87-107, 2019.
- [75] A. G. Garibay Hernández, D. R. Vázquez , M. d. P. Sánchez Saavedra, C. L. Serrano y A. Martínez Jiménez, «Biodiesel a Partir de Microalgas,» *BioTecnología*, vol. 13, nº 3, pp. 38- 61, 2009.
- [76] D. M. Frampton, R. H. Gurney, G. A. Dunstan, L. A. Clementson, M. C. Toifl, C. B. Pollard, S. Burn, I. D. Jameson y S. I. Blackburn, «Evaluation of growth, nutrient utilization and production of bioproducts by a wastewater- isolated microalga,» *Bioresource Technology*, vol. 130, pp. 261- 268, 2013.
- [77] S. Hena, S. Fatimah y S. Tabassum, «Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production,» *Water Resources and Industry*, nº 10, pp. 1-14, 2015.
- [78] N. Abdel-Raouf, A. A. Al-Homaidan y I. Ibraheem, «Microalgae and Wastewater Treatment,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, pp. 257-275, 2012.
- [79] J. U. Grobbelaar , «Inorganic Algal Nutrition,» de *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*, UK, Wiley Blackwell, 2013, pp. 123-133.
- [80] D. E. Canfield, E. Kristensen y B. Thamdrup, «The Nitrogen Cycle,» de *Advances in Marine Biology*, 2005, pp. 205-267.
- [81] C. Band Schmidt, «Aislamiento, Purificación y Mantenimiento de Cepas de Microalgas,» de *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*, La Paz, Baja California Sur, 2007, pp. 1-11.
- [82] Y. Ge, J. Lui y G. Tian, «Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor,» *Bioresource Technology* , vol. 102, pp. 130-134, 2011.
- [83] J. D. Wehr , R. G. Sheath y J. P. Kociolek, *Freshwater algae of North America. Ecology and classification.*, San Diego : Academic Press, 2015.
- [84] N. Haris, H. Manan, M. Jusoh, H. Khatoon, T. Katayama y N. Azman Kasan, «Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species,» *Aquaculture Reports* , vol. 22, 2021.
- [85] J. Church, J.-H. Hwang, K.-T. Kim, R. McLean, Y.-K. Oh, B. Nam, J. Chul Joo y W. Hyung Lee, «Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production,» *Bioresource Technology* , vol. 243, pp. 147-153, 2017.

- [86] M.-s. Miao, X.-d. Yao, L. Shu, Y.-j. Yan, Z. Wang, N. Li, X.-t. Cui, Y.-m. Lin y Q. Kong, «Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater,» *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp. 1-6, 2016.
- [87] M. Hultberg, H. Larsson Jonsson, K. J. Bergstrand y A. S. Carlsson, «Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*,» *Bioresource Technology*, pp. 465-467, 2014.
- [88] L. Ferro, Z. Gojkovic, R. Muñoz y C. Funk, «Growth performance and nutrient removal of a *Chlorella vulgaris*-*Rhizobium* sp. co-culture during mixotrophic feed-batch cultivation in synthetic wastewater,» *Algal Research*, vol. 44, 2019.
- [89] M. Russel, Q. Meixue, A. Alam, L. Lifen, M. Daroch, C. Blaszcak-Boxe y G. K. Gupta, «Investigating the potentiality of *Scenedesmus obliquus* and *Acinetobacter pittii* partnership system and their effects on nutrients removal from synthetic domestic wastewater,» *Bioresource Technology*, 2019.
- [90] J. T. d. Fontoura, G. S. Rolim, M. Farenzena y M. Gutterres, «Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalga *Scenedesmus* sp.,» *Process Safety and Environment Protection*, 2017.
- [91] N. Talapatra, R. Gautam, V. Mittal y U. Ghosh, «A comparative study of the growth of microalgae-bacteria symbiotic consortium with the axenic culture of microalgae in dairy wastewater through extraction and quantification of chlorophyll,» *Materials today: Proceedings*, 2021.
- [92] V. Ramesh Kumar, G. Narendrakumar, R. Thyagarajan y G. Melchias, «A comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress,» *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018.
- [93] S. Hena, S. Fatimah y S. Tabassum, «Cultivation of Algae Consortium in a Dairy Farm Wastewater for Biodiesel Production,» *Water Resources and Industry*, vol. 10, pp. 1- 14, 2015.
- [94] S. Ye, L. Gao, J. Zhao, M. An, H. Wu y M. Li, «Simultaneous wastewater treatment and lipid production by *Scenedesmus* sp. HXY2,» *Bioresource Technology*, vol. 302, 2020.
- [95] K. P. Papadopoulos, C. N. Economou, S. Dailianis, N. Charalampous, N. Stefanidou, M. Moustaka-Gouni, A. G. Tekerlekopoulou y D. V. Vayenas, «Brewery wastewater treatment using cyanobacterial-bacterial settleable aggregates,» *Algal Research*, vol. 49, 2020.
- [96] G. Chaneva, S. Furnadzhieva, K. Minkova y J. Lukavsky, «Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthonema africanum* -a prospective phycobiliprotein- producing strain,» *J Appl Phycol*, vol. 19, pp. 537-544, 2007.
- [97] J. Wang, W. Zhou, H. Yang, F. Wang y R. Ruan, «Trophic mode conversion and nitrogen deprivation of microalgae for high ammonium removal from synthetic wastewater,» *Bioresource Technology*, vol. 196, pp. 668-676, 2015.
- [98] M. Sacristán de Alva, V. M. Luna Pabello, E. Cadena Martínez y A. F. Alva Martínez, «Producción de Biodiesel a Partir de Microalgas y una Cianobacteria Cultivadas en Diferentes Calidades de Agua,» *Agrociencia*, vol. 48, pp. 271- 284, 2014.
- [99] K. Li, Q. Liu, F. Fang, R. Luo, Q. Lu, W. Zhou, S. Huo, P. Cheng, J. Liu, M. Addy, P. Chen, D. Chen y R. Ruan, «Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review,» *Bioresource Technology*, 2019.
- [100] A. Richmond, «Inorganic Algal Nutrition,» de *Handbook of Microalgal Culture*, Wiley Blackwell, 2013, pp. 123-133.

- [101] A. Fazeli Danesh, S. Ebrahimi, A. Salehi y A. Parsa, «Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 125, pp. 56-64, 2017.
- [102] G. Mujtaba, R. Muhammad, G. Kim y K. Lee, «Removal of nutrients and COD through co-culturing activated sludge and immobilized *Chlorella vulgaris*,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 343, pp. 155-162, 2018.
- [103] M. B. Benítez, P. Champagne, A. Ramos , A. F. Torres y V. Ochoa-Herrera, «Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae,» *Environmental technology*, pp. 1-9, 2018.
- [104] O. N. Tsolcha, A. G. Tekerlekopoulou, C. S. Akrotos, G. Aggelis , S. Genitsaris , M. Moustaka-Gouni y D. V. Vayenas , «Biotreatment of raisin and winery wastewater and simultaneous biodiesel production using a *Leptolyngbya*-based microbial consortium,» *Journal of Cleaner Production*, vol. 148, pp. 185-193, 2017.
- [105] Q. Hu, «Environmental Effects on Cell Composition,» de *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*, UK, Wiley Blackwell, 2013, pp. 115-122.
- [106] C.-Y. Chen y Y. H. Chang, «Engineering strategies for enhancing *C. vulgaris* ESP-31 lipid production using effluents of coke-making wastewater,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 125, nº 6, pp. 710-716, 2018.
- [107] D. Nagarajan, D. J. Lee, C. Y. Chen y J. S. Chang, «Resource recovery from wastewater using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective,» *Bioresource Technology*, 2020.
- [108] A. Pandey, A. Gupta, A. Sunny, S. Kumar y S. Srivastava, «Multi-objective optimization of media components for improved algae biomass, fatty acid and starch biosynthesis from *Scenedesmus* sp. ASK22 using desirability function approach,» *Renewable Energy*, 2019.
- [109] L. Shen, J. Damascene Ndayambaje, T. Murwanashyaka, W. Cui, E. Manirafasha, C. Chen , Y. Wang y Y. Lu, «Assessment upon heterotrophic microalgae screened from wastewater microbiota for concurrent pollutants removal and biofuel production,» *Bioresource Technology*, 2017.
- [110] M. K. Kim , J. W. Park , C. S. Park , S. J. Kim, K. H. Jeune , M. U. Chang y J. Acreman, «Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater,» *Bioresource Technology*, vol. 98, pp. 2220-2228, 2007.
- [111] J. K. Pittman, A. P. Dean y O. Osundeko, «The Potential of Sustainable Algal Biofuel Production Using Wastewater Resources,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 17- 25, 2011.
- [112] M. Cobos Ruíz, J. D. Paredes Rodríguez y J. C. Castro Gómez, «Induction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress,» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 21, nº 1, pp. 17-26, 2016.
- [113] S. Khanra, M. Mondal, G. Halder, O. N. Tiwari, K. Gayen y T. K. Bhowmick, «Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review,» *Food and Bioproducts Processing*, 2018.
- [114] E. B. D'Alessandro y N. R. Antoniosi Filho, «Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 58, pp. 832-841, 2016.
- [115] A. Richmond y H. Qiang, «Photosynthesis in Microalgae,» de *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*, Reino Unido, Wiley Blackwell, 2012, pp. 21-36.
- [116] L. R. Mur, «Some aspects of the ecophysiology of cyanobacteria,» *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, vol. 134 B, pp. 61-72, 1983.

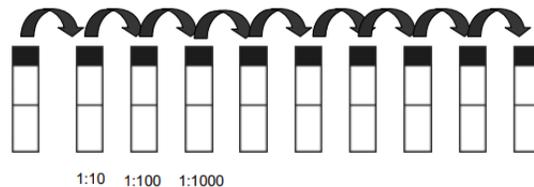
- [117] L. T. Arashiro , M. Boto-Ordóñez, S. W. H. Van Hulle, I. Ferrer, M. Garfí y D. P. L. Rousseau, «Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater,» *Bioresource Technology*, vol. 3030, 2020.
- [118] J. Singh y I. Shekhar Thakur, «Evaluation of cyanobacterial endolith *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for integrated wastewater treatment and biodiesel production: A toxicological perspective,» *Algal Research*, vol. 11, pp. 294-303, 2015.
- [119] P. Orantes Calleja , P. López de Paz, A. Rosales Quintero , C. Meza Avendaño , L. Vereá y K. E. Díaz Santiago , «Comparative optimization of macronutrient removal from a cyanobacterium and a microalga grown in synthetic wastewater for potential use as a biodiesel source,» *Biofuels*, pp. 1-13, 2022.

ANEXOS

Anexo 1

Aislamiento de microalgas por medio de diluciones seriadas y cultivo en placas de agar

Para aislar microalgas por medio de diluciones seriadas, se toma 1 mL de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de medio de cultivo estéril (como se muestra en la figura), se homogeniza y luego se agrega 1 mL a un segundo tubo con 9 mL de medio, se homogeniza y así sucesivamente. El número de diluciones depende de la concentración de la microalga que se desea aislar y el intervalo de dilución que se utiliza normalmente es de 10^{-3} a 10^{-6} , dependiendo de la densidad poblacional. Las transferencias se van realizando en cada una de las diluciones, y al mismo tiempo se pueden ir observando los resultados en el microscopio.



Aislamiento de microalgas por diluciones seriadas.

Después de realizar las diluciones necesarias para disminuir la concentración celular de las microalgas, se utiliza la técnica de rayado en estrías en una caja de Petri con agar. Este método también se emplea para purificar cultivos contaminados con otros microorganismos. Se prepara el medio de cultivo apropiado (para esta investigación se utilizó el medio BG11), adicionando entre 0.8 y 2 % de agar. Se esteriliza en autoclave a 120°C y 1.1 kg cm^{-2} de presión durante 15 min. Posteriormente, se deja a temperatura ambiente y antes que se solidifique se vacía en cajas de Petri estériles. Se colocan una o dos gotas, en las cajas con medio sólido, que se esparcen con un asa para bacteriología o con una varilla de vidrio doblada, previamente esterilizadas. La caja se cubre con su tapa, se invierte y se coloca en un ambiente con temperatura y luz controladas; se incuba durante 4 a 8 días y posteriormente se observa al microscopio invertido y/o estereoscopio y con la ayuda del asa se seleccionan las colonias libres de otros microorganismos, que se transfieren a otra caja de Petri. Esta tarea se realiza las veces que sea necesario hasta asegurar el éxito del aislamiento de un solo tipo de microalga.

Anexo 2

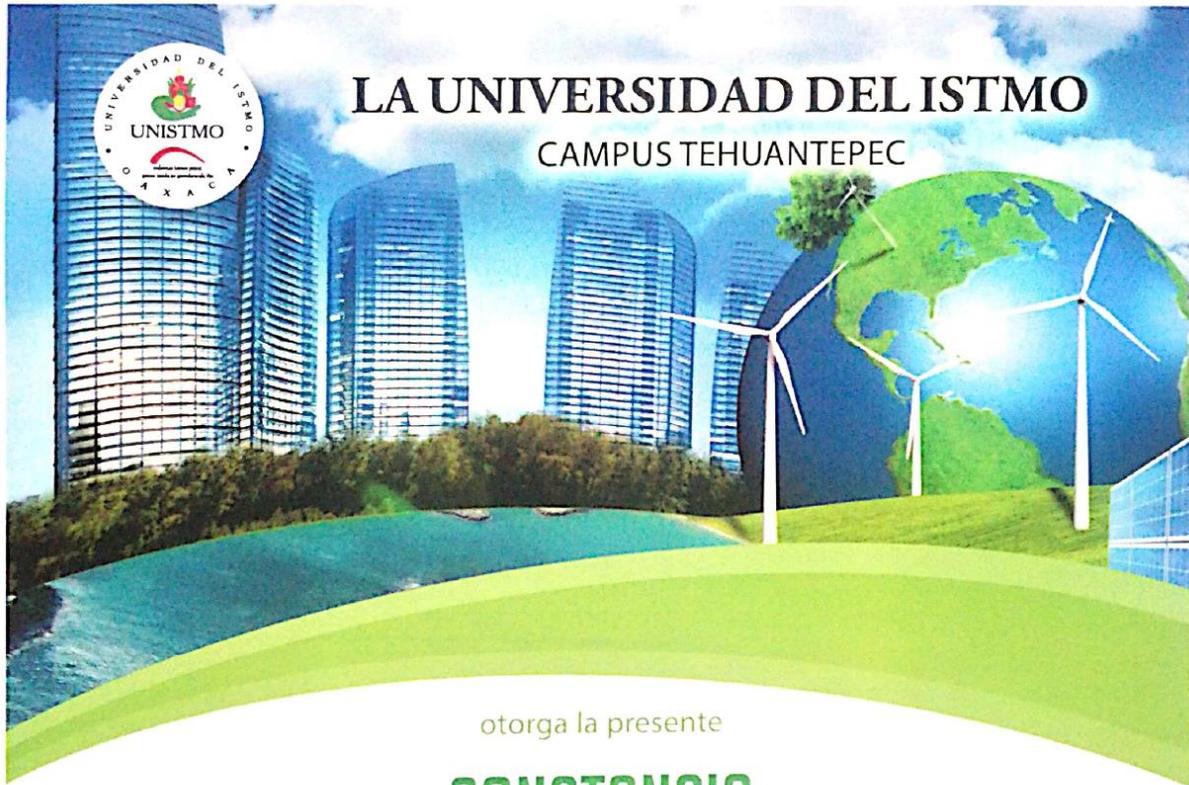
Productos alcanzados a lo largo del trabajo de investigación





LA UNIVERSIDAD DEL ISTMO

CAMPUS TEHUANTEPEC



otorga la presente

CONSTANCIA

a: Paula Deyanira Orantes Calleja, Pascual López de Paz,
Arnulfo Rosales Quintero

Por su participación en el

**3^{er.} Congreso Internacional
en ENERGIAS RENOVABLES**

Bahías de Huatulco, Oaxaca, México / del 13 al 15 de noviembre de 2019.

Dr. Israel Flores Sandová
Dr. Israel Flores Sandová
Vice-Rector Académico





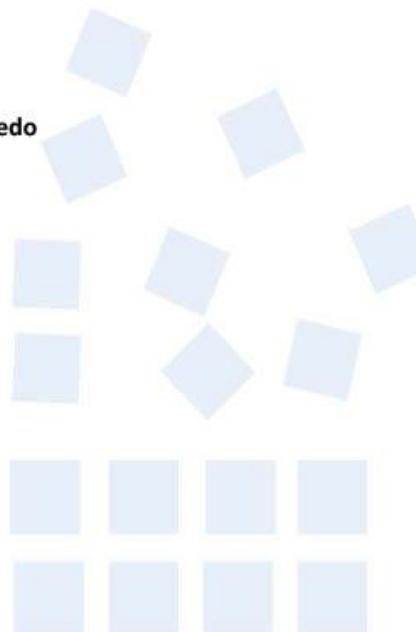
August 2021

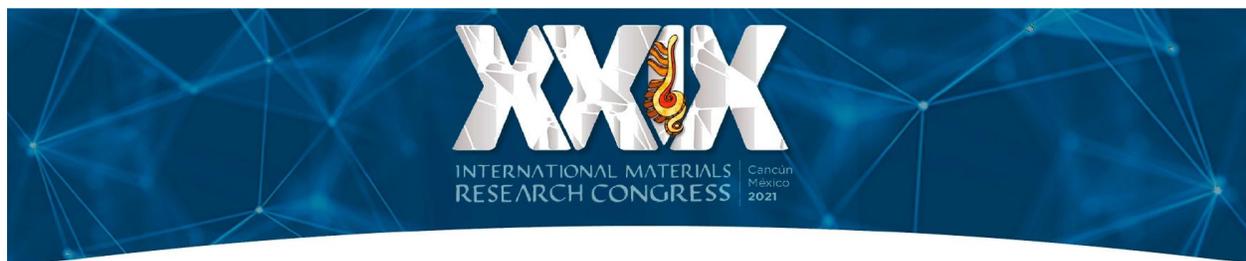
TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

This is to certify that *Paula Deyanira Orantes Calleja, Pascual Lopez de Paz, Arnulfo Rosales Quintero, Laura Elena Vereá Valladares, Neín Farrera, Joel Moreira Acosta* presented the contribution: **OPTIMIZATION OF CHLORELLA VULGARIS CULTIVATION IN SYNTHETIC WASTEWATER AND ITS BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**. as Poster modality, in the *B1. Materials and the Environment* Symposium at the **XXIX International Materials Research Congress** held in Cancun, Mexico from August 15th to 20th, 2021.

Sincerely,

Patricia del Carmen Zambrano Robledo
President





The Organizing Committee Acknowledges the Participation of

Paula Deyanira Orantes Calleja

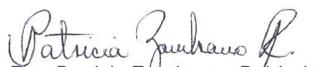
In the tutorial:

**Novel Techniques for Electron Microscopy of Nanomaterials and
their Heterostructures**

Imparted at the

XXIX International Materials Research Congress

held in Cancun, Mexico, from August 15th to 20th, 2021


Dra. Patricia Zambrano Robledo
President 2021-2022





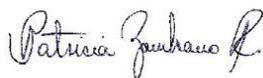
August 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

P r e s e n t

This is to certify that *Paula Deyanira Orantes Calleja, Pascual López de Paz, Laura Elena Vereá Valladares, Karla Eugenia Díaz Santiago, Arnulfo Rosales Quintero, Carlos Meza* presented the contribution: **OPTIMIZATION OF A CYANOBACTERIUM GROWN IN SYNTHETIC WASTEWATER FOR POTENTIAL USE AS A BIODIESEL SOURCE** as **Poster** modality, in the *C4. Advances on Biofuels: Materials, Characterization, Processing and Testing* Symposium at the **XXX International Materials Research Congress and International Conference on Advanced Materials** held in Cancun, Mexico from August 14th to 19th, 2022.

Sincerely,



Patricia del Carmen Zambrano Robledo
President





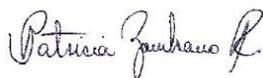
August 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

P r e s e n t

This is to certify that *Karla Eugenia Díaz Santiago, Pascual López de Paz, Paula Deyanira Orantes Calleja, Arnulfo Rosales Quintero, Laura Elena Verea Valladares* presented the contribution: **STUDY OF BIOMASS AND LIPID YIELDS OF CHLORELLA SP. CULTIVATED IN AUTOTROPHIC AND MIXOTROPHIC MEDIA FOR POTENTIAL USE IN BIOFUELS.** as **Poster** modality, in the *C4. Advances on Biofuels: Materials, Characterization, Processing and Testing* Symposium at the **XXX International Materials Research Congress and International Conference on Advanced Materials** held in Cancun, Mexico from August 14th to 19th, 2022.

Sincerely,



Patricia del Carmen Zambrano Robledo
President

