



# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN  
ENERGÍA RENOVABLES

## TESIS

EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO  
DE CULTIVO DE MICROALGAS EN CONDICIONES  
MIXOTRÓFICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE  
ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS A  
ESCALA FOTOBIORREACTOR

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN MATERIALES Y SISTEMAS  
ENERGÉTICOS RENOVABLES

PRESENTA

**ANA GABRIELA ZENTENO CARBALLO**

DIRECTOR  
**DR. JOEL PANTOJA ENRIQUEZ**

CO-DIRECTORA  
**DRA. YAZMIN SANCHEZ ROQUE**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

noviembre de 2024.



# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS AUTÓNOMA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 18 de octubre de 2024

Oficio No. SA/DIP/0727/2024

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. Ana Gabriela Zenteno Carballo**

**CVU: 1079608**

**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 **Evaluación y optimización de un medio de cultivo de microalgas en condiciones mixotróficas para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a escala fotobiorreactor** cuyo Director de tesis es el Dr. Joel Pantoja Enríquez (CVU: 200978) y Co-Directora la Dra. Yazmin Sánchez Roque (CVU: 512026)) 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**



**DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

C.c.p. Dr. José Francisco Pola Albores, Director del Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables UNICACH. Para su conocimiento.

Dra. Laura Elena Vereza Valladares, Coordinadora de Posgrado, Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, UNICACH. Para su conocimiento.

Archivo/minutario.

RJAG/COG/hvb/igp/gtr

**2024 Año de Felipe Carrillo Puerto**  
**BENEMÉRITO DEL PROLETARIADO,**  
**REVOLUCIONARIO Y DEFENSOR DEL MAYAB.**



**Secretaría Académica**

**Dirección de Investigación y Posgrado**

Libramiento Norte Poniente No. 1150

Colonia Lajas Maciel C.P. 29039

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Tel:(961)6170440 EXT.4360

investigacionyposgrado@unicach.mx



## DEDICATORIA

*Primeramente, a Dios*, por la oportunidad de la vida y por la salud.

*A mis padres y mis hermanos*, por la dicha de tenerlos, por estar presentes en los buenos y malos momentos, por disfrutar a mi lado este proceso.

*A mi familia, mi esposo Ángel y a nuestros hijos André y Valentina*, por ser mi impulso en la vida y por hacer de mí una mejor persona cada día.



## AGRADECIMIENTOS

*Al Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables* de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por la oportunidad de realizar el doctorado y por el apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

*A la Universidad Politécnica de Chiapas*, por facilitarme el uso de sus laboratorios en el desarrollo de este proyecto de investigación.

*Al cuerpo Académico de Investigación y Desarrollo Agroindustrial* de la Universidad Politécnica de Chiapas, por su apoyo invaluable durante los cuatro años del desarrollo del proyecto de investigación.

*Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)*, por la beca otorgada para los estudios de doctorado.

*Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del estado de Chiapas (ICTIECH)*, por el apoyo económico único otorgado para la conclusión de estudios de posgrado, dentro de la convocatoria de Apoyos Únicos otorgados a los integrantes del Sistema Estatal de Investigadores 2024.

*A mi comité tutorial*, a la Dra. Yolanda Del Carmen Pérez Luna, al Dr. Roberto Berrones Hernández, al Dr. Guillermo Ibáñez Duharte, por sus valiosas aportaciones, pero especialmente a mis directores, la Dra. Yazmin Sánchez Roque y el Dr. Joel Pantoja Enríquez, por su apoyo incondicional y sus invaluable aportaciones durante estos cuatro años, además de ser grandes referentes no solamente como investigadores, si no también, por ser extraordinarios seres humanos, muy agradecida con ustedes por ser parte de este proceso.



## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	9
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES.....	16
1.1 Planteamiento del problema.....	16
1.2 Justificación.....	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.4 Objetivos.....	18
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Microalgas.....	19
2.2 Condiciones de crecimiento de las microalgas: parámetros de cultivo.....	25
2.3 Metabolismo de las microalgas para la síntesis de lípidos.....	31
2.4 Sistemas de cultivo para microalgas.....	33
2.5 Medios de cultivo para microalgas.....	41
2.6 Producción de biodiesel a partir de biomasa microalgal.....	43
2.7 Transesterificación de ácidos grasos.....	45
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	47
3. 1 Diseño experimental.....	47
3.2 Preparación del lixiviado de lombricomposta como medio de cultivo mixotrófico...	49
3.3 Establecimiento del sistema de cultivo.....	51
3.4 Preparación del medio de cultivo.....	56
3.5 Análisis de densidad celular.....	56
3.6 Extracción de lípidos.....	57
3.7 Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).....	57
3.8 Análisis estadístico.....	58
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1 Caracterización de los materiales de la composta.....	59



4.2 Caracterización fisicoquímica del lixiviado de lombricomposta.....	61
4.3 Productividad de la biomasa microalgal de <i>Scenedesmus acutiformis</i> .....	62
4.4 Productividad de lípidos de <i>Scenedesmus acutiformis</i> .....	68
4.5 Caracterización de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de <i>Scenedesmus acutiformis</i> .....	74
4.6 Optimización de las variables de producción de lípidos de <i>Scenedesmus acutiformis</i> .....	78
CONCLUSIONES.....	82
TRABAJOS FUTUROS Y RECOMENDACIONES .....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos predominantes, productos de almacenamiento y componentes celulares de los principales grupos de algas.....	8
Tabla 2. Contenido de lípido producidos por algunas especies de microalgas.....	27
Tabla 3. Contenido de lípido producidos por algunas especies de microalgas.....	32
Tabla 4. Diseño experimental para la evaluación de <i>Scenedesmus sp</i> en tres sistemas de cultivo.....	38
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los residuos utilizados para la composta...	50
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del lixiviado de lombricomposta.....	53
Tabla 7. Comparación de tratamientos y sistemas de cultivo en la productividad de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica.....	64
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de <i>Scenedesmus acutiformis</i> cultivado en lixiviado de lombricomposta en FBR de columna.....	65
Tabla 9. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de <i>Scenedesmus acutiformis</i> cultivado en lixiviado de lombricomposta en FBR de placa plana.....	66
Tabla 10. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de <i>Scenedesmus acutiformis</i> cultivado en lixiviado de lombricomposta en un sistema de cultivo abierto.....	66
Tabla 11. Análisis de la varianza modelo lineal para determinar la optimización de la producción de lípidos.....	72
Tabla 12. Análisis de la varianza modelo cuadrático para determinar la optimización de la producción de lípidos.....	72



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Célula de una microalga.....	10
Figura 2. Factores de crecimiento de las microalgas.....	14
Figura 3. Sistemas convencionales de cultivo de microalgas .....	22
Figura 4 Etapas del cultivo de las microalgas.....	31
Figura 5. Reacción de transesterificación de ácidos grasos provenientes de microalgas.....	33
Figura 6. Etapas de la degradación de la composta y producción de lixiviado durante un periodo de 90 días.....	42
Figura 7 Diseño del sistema de cultivo cerrado, a) fotobiorreactor de columna con capacidad para 3 L.....	43
Figura 8 FBR de columna con capacidad para 3 L evaluado bajo condición mixotrófica.....	43
Figura 9. Diseño del sistema de cultivo cerrado, a) fotobiorreactor de placa plana con capacidad para 3 L.....	44
Figura 10. FBR de placa plana con capacidad para 3 L evaluado bajo condición mixotrófica.....	45
Figura 11. Diseño del sistema de cultivo abierto (raceway) con capacidad para 5 L.....	46
Figura 12. Sistema de cultivo abierto (raceway) con capacidad para 5 L evaluado en condición mixotrófica.....	46
Figura 13. Densidad celular alcanzada a los 30 días de <i>Scenedesmus acutiformis</i> utilizando como medio de cultivo lixiviado de lombricomposta.....	51



Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica en un FBR de columna, en un periodo de evaluación de 30 días.....	55
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica en un FBR de placa plana, en un periodo de evaluación de 30 días.....	56
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica en un sistema abierto en un periodo de evaluación de 30 días.....	57
Figura 17. Densidad celular alcanzada a los 30 días de <i>Scenedesmus acutiformis</i> utilizando como medio de cultivo lixiviado de lombricomposta.....	58
Figura 18. Rendimiento de la biomasa seca de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica en tres sistemas de cultivo.....	59
Figura 19. Rendimiento de lípidos de <i>Scenedesmus acutiformis</i> en condición mixotrófica en tres sistemas de cultivo.....	62
Figura 20. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de <i>Scenedesmus acutiformis</i> propagado en lixiviado de lombricomposta.....	68
Figura 21. Diagrama de Pareto estandarizada para eficiencia en la producción de lípidos.....	73
Figura 22. Superficie respuesta estimada para optimizar la productividad de <i>Scenedesmus acutiformis</i> .....	74



## INTRODUCCIÓN

El creciente y constante incremento de la población mundial ha puesto en riesgo la disponibilidad de recursos esenciales para satisfacer la demanda mundial de alimentos, agua, y energía, por lo que se deberán buscar y adoptar sistemas alimentarios y energéticos más resilientes (Manzoni et al., 2021).

La crisis de los combustibles fósiles y la dependencia forzada de los países no productores de petróleo, de los que sí lo producen, afecta no solo a la economía de los primeros; sino también, a su autonomía e independencia alimentaria y productiva (Serna et al, 2011). Por esa razón, los biocombustibles alcanzan cada vez una mayor relevancia como combustibles alternativos de menor impacto ambiental.

El creciente interés por desarrollar combustibles de fuentes renovables ha abierto la oportunidad de investigar fuentes no convencionales con alto potencial (Assunção y Malcata, 2020). En este sentido, la biomasa procedente de las microalgas ha sido identificada como materia prima con alto potencial, ya que ofrece una variedad importante de posibilidades en la generación de compuestos de interés en el área alimentaria, farmacéutica, energética, entre otros (Wibisono et al., 2019). En los últimos años se ha estudiado la producción de lípidos con potencial para la generación de biodiesel a partir del cultivo de microalgas, ya que se ha demostrado que el aceite proveniente de las especies de microalgas supera al contenido de aceite de todas las fuentes vegetales cultivadas actualmente (Loera y Olguín, 2010), las microalgas poseen además un metabolismo mixotrófico que les permite crecer en medios como aguas residuales y lixiviados, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimentos.

Las microalgas son organismos fotosintéticos muy abundantes en la naturaleza, los cuales son capaces de producir una gran variedad de compuestos según sus condiciones y medios de cultivo, de esta manera se pueden modular la producción metabólica de biomoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos, minerales, vitaminas y enzimas (Barros et al., 2019). Aunado a su potencial como materia prima para la industria, se ha identificado también su capacidad en la biorremediación de aguas residuales



proporcionando un camino viable y prometedor en términos de eliminación de aguas residuales y generación de bioenergía de tercera generación (Hu et al., 2022). Dentro de las múltiples ventajas del cultivo de algas se encuentra, además, la captación de CO<sub>2</sub> y la remoción de contaminantes en aguas residuales, se han estudiado también, métodos eficientes y de bajo costo para la extracción de lípidos (Rugnini, 2018). Actualmente se estudian sistemas de cultivo y medios de cultivos alternativos principalmente para la producción de lípidos para biodiesel y la síntesis de compuestos de alto valor añadido (Assunção & Malcata, 2020), a su vez se busca disminuir los costos de producción de microalgas y eficientizar el proceso a nivel industrial, de modo que, alternativas como el uso de lixiviados o aguas residuales como medio de cultivo han mostrado un importante rendimiento y bajo costo de producción (Daneshvar et al., 2020).

Existe un área de investigación permanente en este sentido, ya que la tecnología para la producción de biodiesel a partir de microalgas aún enfrenta grandes retos para lograr una producción a escala comercial y de manera rentable. Se busca, por ende, la selección de cepas con mayor índice de producción de biomasa y de lípidos a un bajo costo y a gran escala, implementar medios de cultivos que optimicen la producción de la biomasa microalgal con potencial lipídico, dentro de las que destacan el uso de aguas residuales y lixiviados que además de permitir la biorremediación y la producción de biomasa. El cultivo de estos microorganismos se realiza en dos tipos de sistemas, por una lado los denominados sistemas o estanques abiertos y los fotobiorreactores cerrados (FBRs), por lo que muchas investigaciones actuales se han centrado en buscar diseños y configuraciones variadas que permitan optimizar el rendimiento de biomasa en el cultivo de microalgas en los últimos años (Manzoni et al., 2021). La diversidad de fotobiorreactores es amplia, sin embargo, aún presentan cuellos de botella para su escalamiento a nivel industrial, principalmente porque se debe estudiar su costo de producción y operación, diseñarse a partir de las necesidades que presente la especie microalgal y los objetivos de su cultivo (Nitsos et al., 2020).

El cultivo de microalgas consta de varias operaciones unitarias, partiendo desde la selección de la cepa hasta la obtención de las biomoléculas de interés de la biomasa microalgal (Manzoni et al., 2021). Desde el punto de vista económico, tanto las condiciones



de cultivo como los procesos relacionados con la cosecha y extracción de biomoléculas son determinantes para determinar la eficiencia del sistema de cultivo (Zhu et al., 2020).

La selección de la cepa de microalga está determinada por los objetivos de su cultivo, es decir, existen cepas con mayor capacidad para producir lípidos, carbohidratos, pigmentos o proteínas. La selección del medio de cultivo tiene que ver con la capacidad metabólica de la microalga, es decir, su fuente de carbono y energía, que pueden ser fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas (Manzoni et al., 2021).

Existe una gran variedad de procesos que buscan realizar la extracción (cosecha) de las microalgas, destacan procesos de filtración, floculación, centrifugación, sedimentación por gravedad, flotación y técnicas electrolíticas, las cuales ofrecen una serie de ventajas y desventajas. Se considera que la cosecha es una de las etapas más importantes desde el punto de vista económico y técnico, de esta operación unitaria depende en gran medida los costos de producción, la calidad de los productos y la eficiencia de los sistemas de cultivo (Peralta et al., 2012).

Las técnicas de extracción de biomoléculas de interés van desde el secado de la biomasa, el pretratamiento para facilitar la lisis celular y finalmente la obtención y purificación de los mismos, la técnica empleada afecta directamente la calidad y cantidad de la biomasa microalgal producida (Deneshvar et al., 2021), por lo que se requieren estudios que garanticen la optimización de estas etapas.

Dada la importancia que representa el desarrollo de sistemas de cultivo para microalgas con fines en la generación de energía renovable, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar y optimizar un medio de cultivo mixotrófico para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de la biomasa microalgal de *Snedesmus acutiformis* cultivada a escala fotobiorreactor.



## RESUMEN

Actualmente se están buscando formas más eficientes de producir y obtener energías renovables, por lo que es pertinente la exploración de la biomasa de las microalgas como fuente de biocombustibles de tercera generación; sin embargo, su escalamiento aun presenta limitaciones, principalmente asociado a los altos costos de su medio de cultivo y factores operativos. En el presente proyecto de investigación se evaluó y optimizó la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de la biomasa microalgal de *Snedesmus acutiformis* bajo condición mixotrófica a escala fotobiorreactor. La evaluación se llevó a cabo utilizando tres sistemas de cultivo, dos fotobiorreactores (FBRs) y un cultivo abierto con capacidad para 5 L, como medio de cultivo se utilizó lixiviado producido a través de lombricompostaje, se utilizaron tres concentraciones 15, 25 y 50%. En los FBRs se evaluó además de la concentración de lixiviado, dos fotoperiodos (12:12 y 16:08), además de dos niveles de iluminación (2500 lux y 3500 lux), la luz fue suministrada en los FBRs mediante luz LED blanca, mientras que en el cultivo abierto se utilizó luz y periodo luz/oscuridad natural. Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de  $1.3 \times 10^3$  Cel mL<sup>-1</sup>, el crecimiento celular se realizó durante 30 días. El lixiviado producido mostró baja concentración de N (0.5 mg/L), suponiendo una limitación en el medio de cultivo. Los resultados mostraron una mayor productividad de biomasa y lípidos en el sistema abierto en comparación con los dos FBRs evaluados, así como mayor productividad en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado. Se logró una máxima densidad celular en los tratamientos de mayor concentración de lixiviado, alcanzando una máxima productividad de  $1.7 \times 10^7$  Cel mL<sup>-1</sup> a los 30 días de evaluación en el tratamiento P6, el cual corresponde al FBR de placa plana, con 50% de lixiviado y 3500 lux de iluminación. La productividad de biomasa seca fue de 31.08 a 776.2 mg L<sup>-1</sup>, siendo mayor en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado, la máxima productividad de biomasa seca fue en A3, sistema abierto con concentración de lixiviado de 50%, alcanzando una productividad de 776.2 mg L<sup>-1</sup>. La productividad de lípidos fue de 12.7 a 51.9%, siendo mayor en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado, así como una mayor productividad en el sistema de cultivo abierto, alcanzándose una acumulación máxima de 51.9% en el tratamiento A3.



La caracterización de los ácidos grasos demostró la presencia de ácidos grasos de cadena larga de 16 a 21 carbonos, encontrándose mayormente ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en un 80%, los cuales contienen entre 2 y 3 insaturaciones, seguido de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) en abundancia aproximada de 20%, siendo el ácido graso más abundante el ácido linolénico  $C_{18}H_{30}O_2$ . Finalmente, el análisis de superficie respuesta mostró que la optimización del medio de cultivo se encuentra en el uso de la concentración de 50% de lixiviado y su implementación en el cultivo abierto, representando una disminución en los costos de producción al utilizar lixiviado como medio de cultivo, así como, disminuir factores operativos como la iluminación y el fotoperiodo prolongado. Estos resultados demuestran el potencial energético de la biomasa producida por *S. acutiformis* como alternativa para la producción de biodiesel.



## ABSTRACT

Currently, more efficient ways to produce and obtain renewable energy are being sought, so the exploration of microalgae biomass as a source of third generation biofuels is pertinent, however, its scaling still presents limitations, mainly associated with high costs of your culture medium and operational factors. In the present research project, the production of fatty acid methyl esters from the microalgal biomass of *Snedesmus acutiformis* was evaluated and optimized under mixotrophic conditions at a photobioreactor scale. The evaluation was carried out using three culture systems, two photobioreactors (FBRs) and an open culture (raceway) with a capacity of 5 L. As a culture medium, leachate produced through vermicompost was used. Three concentrations were used: 15, 25 and 50%. In the FBRs, in addition to the leachate concentration, two photoperiods (12:12 and 16:08) were evaluated, in addition to two lighting levels (2500 lux and 3500 lux), the light was supplied in the FBRs using white LED light, while in open cultivation light and natural light/dark period were used. The cultures were started with a cell density of  $1.3 \times 10^3$  Cell mL<sup>-1</sup>, cell growth was carried out for 30 days. The leachate produced showed a low concentration of N (0.5 mg L<sup>-1</sup>), assuming a limitation in the culture medium.

The results showed greater productivity of biomass and lipids in the open system compared to the two FBRs evaluated, as well as greater productivity in the treatments with higher leachate concentration. A maximum cell density was achieved in the treatments with the highest leachate concentration, reaching a maximum productivity of  $1.7 \times 10^7$  Cel mL<sup>-1</sup> after 30 days of evaluation in the P6 treatment, which corresponds to the flat plate FBR, with 50% of leachate and 3500 lux of lighting. The productivity of dry biomass was from 31.08 to 776.2 mg L<sup>-1</sup>, being higher in the treatments with the highest concentration of leachate, the maximum productivity of dry biomass was in A3, open system with leachate concentration of 50%, reaching a productivity of 776.2 mg L<sup>-1</sup>. Lipid productivity was from 12.7 to 51.9%, being higher in the treatments with a higher concentration of leachate, as well as higher productivity in the open cultivation system, reaching a maximum accumulation of 51.9% in treatment A3.

The characterization of the fatty acids demonstrated the presence of long-chain fatty acids of 16 to 21 carbons, with 80% being mostly polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which



contain between 2 and 3 unsaturations, followed by monounsaturated fatty acids (MUFAs) in approximate abundance of 20%, with the most abundant fatty acid being linolenic acid  $C_{18}H_{30}O_2$ . Finally, the response surface analysis showed that the optimization of the culture medium is found in the use of the 50% concentration of leachate and its implementation in open cultivation, representing a decrease in production costs when using leachate as a means of cultivation, as well as, reducing operational factors such as lighting and prolonged photoperiod. These results demonstrate the energy potential of the biomass produced by *S. acutiformis* as an alternative for the biodiesel production.



## CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

### 1.1 Planteamiento del problema

Aunque en los últimos años los avances en las investigaciones sobre el uso potencial de la biomasa microalgal para la producción de biocombustibles ha sido demostrada, la producción a gran escala sigue siendo un problema importante, principalmente porque hasta el momento no se conoce una cepa de microalga capaz de satisfacer al mismo tiempo todos los requisitos que permitan considerarla como materia prima óptima para la producción de biocombustibles. Esto se debe a que el rendimiento en la producción de biomasa depende de diversos factores para optimizar el rendimiento de la biomasa, el contenido de lípidos como el perfil de ácidos grasos de las microalgas varía no solo entre especies sino también en función de las condiciones del cultivo (Bellou et al., 2014, Assuncao et al., 2020), siendo determinante la selección de las mejores cepas y condiciones de cultivo que permitan alcanzar la máxima productividad de lípidos con un perfil de ácidos grasos que otorgue calidad al biodiesel. Una de las limitantes principales del cultivo a escala industrial de las microalgas son los costos de los componentes del medio de cultivo, por lo que se requiere buscar medios de cultivo de bajo costo (Ortiz et al, 2012). Se requiere además conocer como las condiciones abióticas regulan las vías de conversión de energía solar y sobre lípidos, biosíntesis y catabolismo, e investigación aplicada que aborde los diversos cuellos de botella biológicos y técnicos del proceso de producción de lípidos (Bellou et al., 2014). Aunque el potencial de las microalgas ha sido demostrado, actualmente, no existen proveedores de aceite de microalgas en el mercado mundial (Plata et al., 2009).



## 1.2 Justificación

La alta eficiencia fotosintética de las microalgas, la producción de biomasa y la capacidad de acumular cantidades relativamente grandes de triacilglicéridos para la conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) los han convertido en una alternativa deseable para la producción de biocombustibles. En los últimos años se ha logrado grandes avances en la tecnología de cultivo de microalgas, resultando en la síntesis de compuestos de alto valor agregado (Assunção y Malcata, 2020). Las tecnologías clave para la producción de biocombustibles de microalgas incluyen la identificación de las condiciones de cultivo óptimas para una alta productividad de aceite, el desarrollo de sistemas de cultivo de microalgas efectivos y económicos, así como la separación y recolección de biomasa y aceite de microalgas (Chen et al., 2011, Mathimani et al., 2015).

El alto potencial lipídico de las microalgas promueve la búsqueda para encontrar formas efectivas de manipular las vías bioquímicas involucradas en la biosíntesis de lípidos y hacia un cultivo de algas rentable (Bellou et al., 2014), su procesamiento en una biorrefinería de microalgas tiene el potencial de competir con la industria petroquímica, donde la producción se destina principalmente a combustibles para los sectores de transporte y energía. Las biorrefinerías pueden ser sostenibles, maximizando la conversión de microalgas en una variedad de productos de mayor valor destinados a la industria química fina, biomateriales y energía, y minimizando la producción de desechos (Taher et al., 2014). Además de los productos que se pueden extraer de la biomasa microalgal, su cultivo tiene el potencial para reducir el 45% de las emisiones que genera la producción y aprovechamiento de los hidrocarburos, 47% de CO<sub>2</sub>, y hasta un 66% las emisiones de partículas al ambiente (Sydney *et al.*, 2010).

Es pertinente la estandarización de un medio de cultivo destinado a un morfotipo específico que permita obtener el máximo rendimiento de biomasa y producción de lípidos, así como su escalamiento a fotobiorreactor, esto permitiría identificar una cepa y su rendimiento en función del medio y condiciones del cultivo (Arias et al., 2013).



### 1.3 Hipótesis

La microalga *Scenedesmus acutiformis* tendrá la capacidad de metabolizar en condiciones mixotróficas a una concentración del 50% de lixiviado de lombricomposta en un fotoperiodo 12/12 horas oscuridad/luz, garantizando una producción de lípidos de 20 a 50% a escala fotobiorreactor.

### 1.4 Objetivos

#### *Objetivo general*

Evaluar y optimizar la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de la biomasa microalgal de *Snedesmus acutiformis* en medios de cultivos mixotrófico a escala fotobiorreactor.

#### *Objetivos Específicos*

- Producir y caracterizar un lixiviado proveniente de la lombricomposta como medio de cultivo mixotrófico para microalgas.
- Evaluar la producción de la biomasa microalgal en condiciones mixotróficas en tres sistemas de fotobiorreactores.
- Extraer y caracterizar los ácidos grasos libres de la biomasa microalgal generada en condiciones mixotróficas.
- Optimizar las variables de producción de lípidos de la biomasa microalgal evaluadas a nivel de tres sistemas de fotobiorreactores.



## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

El estudio de las microalgas comprende desde su morfología hasta la caracterización de su biomasa, por lo que en este capítulo se abordarán los aspectos relacionados con las características morfológicas y de crecimiento de las microalgas, así como, el metabolismo celular el cual se asocia al medio y sistema de cultivo, posteriormente se describirán los principales parámetros de cultivo, finalmente, se describirá la síntesis de esteres metílicos de ácidos grasos y su conversión a biodiesel mediante el proceso de transesterificación.

### 2.1 Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos muy abundantes sobre los ecosistemas terrestres, principalmente en el agua, pudiéndose encontrar en agua salada y dulce (Oliveira, 2017). Constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos unicelulares, con particularidades en su metabolismo, mismo que puede ser autótrofo, heterótrofo y mixotrófico (Bhatnagar et al., 2011). Se clasifican en procariotas algas verdes y azules (cianobacterias) y microalgas eucariotas que se dividen a su vez en *clorofitas*, *Phaeocophyta* y *Chrysophyceae* según el tipo de sus pigmentos fotosintéticos (verde, marrón y oro, respectivamente) (Graham y Wilcox, 2000). Se han utilizado además clasificaciones de las microalgas entre los que destacan los tipos de pigmentos fotosintéticos, la naturaleza de la cubierta celular y el tipo de reservas de almacenamiento presentes en ellas (Graham y Wilcox, 2000). La presencia de clorofila y otros pigmentos favorece la alta eficiencia para la fijación de CO<sub>2</sub> y la utilización de la energía solar para producir biomasa, con una eficiencia hasta cuatro veces superior al de las plantas. La biomasa de las microalgas contiene una amplia gama de productos químicos, como lípidos, azúcares, proteínas, pigmentos (tabla 1), colorantes, antioxidantes, biopoliésteres y varios derivados biológicos de alto valor comercial (Assunção y Malcata, 2020).

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos predominantes, productos de almacenamiento y componentes celulares de los principales grupos de algas.

Tipo de alga	Pigmentos fotosintéticos	Productos de almacenamiento	Cubierta celular
Cianobacteria ( <i>Chloroxybacteria</i> )	Clorofila <i>a</i> , ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina, $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Gránulos de cianoficina, almidón de cianofitán (glucógeno)	Peptidoglicano
<i>Prochlorophytes</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Almidón de cianofitán (glucógeno)	Peptidoglicano
<i>Glaucophyta</i>	Clorofila <i>a</i> , ficocianina, aloficocianina, $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Almidón	Celulosa
<i>Euglenophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , $\beta$ - caroteno, otros carotenos y Xantofilas.	Paramilo	Película proteínica debajo de la membrana plasmática.
<i>Cryptophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , ficocianina, ficoeritrina, $\alpha$ , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Almidón	Periplasto proteínico debajo de la membrana plasmática.
<i>Haptophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Crisolaminarina	Escamas de CaCO <sub>3</sub>
<i>Dinophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Almidón	Placas celulósicas en vesículas debajo de la membrana plasmática.
<i>Ochrophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>c</i> , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Crisolaminarina, lípidos	Algunos no presentan cubierta, algunos con sílice / escamas orgánicas, celulosa, presencia de alginatos en algunos.
<i>Rhodophyta</i>	Clorofila <i>a</i> , ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, $\alpha$ , $\beta$ - caroteno, xantofilas.	Almidón floridiano	Se desconoce la composición.
<i>Chlorophyta</i>	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> $\beta$ - caroteno, otros carotenos y Xantofilas	Almidón	Celulosa, polisacáridos sulfatados, algunos calcificados.

\*Adaptado y traducido de Graham y Wilcox, 2000.

*Scenedesmus sp* es un género de algas verdes unicelulares que pertenecen al grupo de las clorofitas (*Chlorophyta*), Las células pueden medir entre 3-78 x 2-10  $\mu$ m, las cuales pueden ser esféricas a elipsoidales, alargadas o fusiformes a fusiformes alargadas (figura 1),

cada célula tiene una pared celular que la protege y le da forma la cual está compuesta de una capa hemicelulósica y esporopolénica, generalmente lisa (Algabase, 2024), poseen uno o varios pirenoides, que son inclusiones proteicas donde se acumulan reservas de almidón, contiene numerosos cloroplastos los cuales son estructuras membranosas que contienen clorofila y realizan la fotosíntesis. Aunque las células son unicelulares, *Scenedesmus* forma colonias o cenobios que consisten en agrupaciones de células de 2 a 32 células que se mantienen unidas en filamentos cortos o colonias en forma de estrella. Su reproducción es de forma asexual mediante la división celular, donde una célula madre se divide en dos células hijas idénticas.

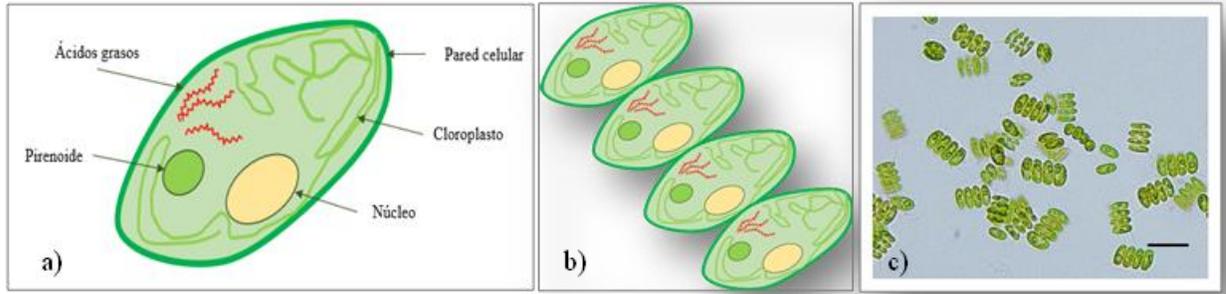


Figura 1. a) Célula de una microalga, b) cenobios de cuatro células de *Scenedesmus sp.*, c) biomasa de *Scenedesmus sp.*

Las microalgas son organismos que poseen plasticidad metabólica, crecen principalmente en agua salina o dulce; sin embargo, según su fuente de carbono y energía, son capaces de realizar el proceso fotosintético en condiciones fotoautotróficas, de forma heterotrófica, o bien, en condición mixotrófica (Daneshvar et al., 2021; Ortiz et al., 2012).

El metabolismo más utilizado por las microalgas es el fotoautótrofo (Chew et al., 2018), a través del cual las microalgas, capturan la energía luminosa, fijan  $\text{CO}_2$  y los convierten mediante el proceso fotosintético en energía química (Yin et al. 2020). Los procesos basados en esta ruta metabólica se consideran más económicos y de menor impacto ambiental que el heterótrofo y mixotrófico, ya que tienen un bajo costo de operación e instalación y menor consumo de energía (Manzoni et al., 2021, Hu et al., 2018). Este tipo de sistemas son ideales para el cultivo abierto de microalgas a gran escala, sin embargo, presenta



limitación por la luz natural, ya que se debe encontrar una ubicación adecuada en función de las condiciones ambientales, o bien de la dependencia de la luz artificial (Daneshvar et al., 2021).

En condiciones de crecimiento fotoautótrofas, la densidad celular máxima de las microalgas que se puede conseguir en fotobiorreactores es de unos 40 g/L, mientras que en cultivos al aire libre en estanques abiertos o en estanques de canalización, la concentración celular suele ser inferior a 10 g/L (Morales et al., 2015). Su uso también presenta desventajas ya que este tipo de metabolismo se limita a ciertas especies que crecen en condiciones específicas como alta salinidad o pH alcalino, así como la necesidad de proteger estos cultivos de contaminantes ambientales (Hu et al., 2018).

El cultivo heterótrofo de las microalgas se da principalmente en sistemas cerrados, el metabolismo se caracteriza por el crecimiento y biosíntesis en ausencia de luz o en condiciones de oscuridad, usando carbón orgánico como fuente de energía y carbono (Hu et al., 2018). Muchas especies de microalgas son capaces de crecer en ausencia de luz, metabolizando a través de la glucólisis y vía pentosas fosfatos compuestos orgánicos, en estos sistemas es posible utilizar aguas residuales o lixiviados como medio de cultivo para las microalgas (Hu et al., 2022). Dentro de las ventajas que ofrece el cultivo heterótrofo, se puede superar el problema del suministro de luz, al no depender de este parámetro durante el proceso, se pueden lograr densidades celulares de hasta 100 g/L, lo que a su vez simplifica la recolección de la biomasa (Morales et al., 2015). Otra de las ventajas que ofrece es el fácil escalamiento y la relativa simplicidad de las operaciones y el fácil mantenimiento (Manzoni et al., 2021). A escala industrial se pueden controlar los parámetros de crecimiento como el pH, temperatura, los niveles de oxígeno y carbono. Dentro de las desventajas del cultivo heterótrofo destaca el incremento de los costos de producción, debido a la necesidad de una fuente de carbono orgánico exógena, y también son susceptibles a la contaminación microbiana y se limitan a producir metabolitos no inducidos por la luz (Manzoni et al., 2021; Fernández et al., 2012). Sin embargo, esta problemática puede abordarse mediante el uso de medios de cultivo de bajo costo como aguas residuales y lixiviados procedentes del compostaje de residuos orgánicos, favoreciendo el doble beneficio que representa el uso de



estos medios, por un lado, la biorremediación y por otro la gestión de residuos respectivamente (Arutselvan et al., 2022; Hu et al., 2022).

Además del metabolismo autótrofo y heterótrofo, las microalgas pueden crecer en condiciones mixotróficas, utilizando la luz como fuente de energía, el CO<sub>2</sub> y el carbono orgánico como fuentes de carbono (Meng et al., 2020). La cualidad más importante del cultivo mixotrófico es la capacidad que tienen las microalgas para metabolizar simultáneamente carbono orgánico e inorgánico, mediante la respiración celular y la fotosíntesis, respectivamente, manteniendo así tanto metabolismo autótrofo como heterótrofo (Zhan et al., 2017). Es importante destacar que para que las microalgas realicen metabolismo mixotrófico se requiere de la presencia de luz para la biofijación de CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis y sustratos orgánicos para la respiración aeróbica mientras que en ausencia de luz el metabolismo se vuelve heterótrofo (Pérez & Bashan, 2015).

Dentro de las ventajas de este tipo de metabolismo se encuentra la facilidad para usar medios de cultivo alternativos, como las aguas residuales y los lixiviados (Patel et al., 2020), pudiéndose utilizar su cultivo como doble estrategia, producción de biomasa y biorremediación de aguas residuales. Estas características representan una la reducción de los costos de producción, ya que los altos costos de los medios de cultivo sintéticos no han permitido su escalamiento a nivel industrial. Además de las ventajas mencionadas, se ha demostrado mayor tasa de crecimiento y productividad de la biomasa por su fase de crecimiento exponencial prolongado, así como la posibilidad de modular la síntesis de biomoléculas de interés (Meng et al., 2020).

Por otro lado, las desventajas que se pueden mencionar, es que no todas las especies de microalgas pueden crecer bajo este metabolismo, por lo que su uso se limita a ciertas especies, son sistemas de cultivo que aún se encuentran en fase de experimentación, se requiere evaluar además la viabilidad de la gran diversidad de sustratos y medios alternativos con morfotipos específicos. En la actualidad los mayores rendimientos en la producción de biomasa se han obtenido mediante cultivo heterótrofo y mixotrófico (Manzoni et al., 2021).

Un aspecto fundamental en los procesos de algas es la selección de la cepa (Daneshvar et al., 2021), ya que de ello depende lograr la mayor productividad de biomasa y por ende la



obtención de los bioproductos de interés. A excepción de las especies de algas modificadas genéticamente, las microalgas se pueden aislar de diferentes ambientes, tanto de agua dulce, como de aguas salobres y marinas, así como de suelos y de aguas residuales (Sánchez et al., 2019).

La selección de la cepa se da en función de los siguientes criterios, (i) los objetivos de su cultivo, hay especies de microalgas con capacidad para producir mayormente un tipo de biomolécula, es decir, microalgas para la producción de lípidos, carbohidratos, proteínas, pigmentos, etc., por lo que se deberá considerar este aspecto; como segundo criterio para la selección de la cepa se encuentra (ii) la capacidad metabólica de la microalga (fotoautótrofa, heterótrofa o mixotrófica), asu vez, este criterio se relaciona con la velocidad de crecimiento, cuantificado normalmente por biomasa total acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen (Mofijur et al., 2022; Fernández et al., 2012), muchas investigaciones actuales están centradas en identificar la capacidad que tiene una cepa para producir biomasa en condición mixotrófica, o en condiciones de estrés fisiológico, con el objetivo de identificar la capacidad metabólica y la síntesis de compuestos utilizando medios de cultivos no convencionales y de bajo costo.

Por lo tanto (iii) su medio y sistema de cultivo también es un criterio para la selección de la cepa, como se ha mencionado anteriormente su escalamiento industrial se encuentra limitado, principalmente por este criterio, por lo que las investigaciones actuales están centradas en buscar por un lado, medios de cultivo de bajo costo utilizando aguas residuales con el objeto de evitar la competencia del uso del agua para fines agrícolas (Editya et al., 2022, Loera y Olguín, 2010), así mismo, se ha propuesto el uso de lixiviados por su elevada composición en macro y micronutrientes indispensables para el crecimiento de las microalgas, este criterio es importante porque de él depende la velocidad de absorción y afinidad por nutrientes de la microalga, particularmente de CO<sub>2</sub>, nitrógeno y fósforo (Amaro et al., 2011). Y por otro lado está la selección del sistema de cultivo, aspectos como su facilidad de operación y mantenimiento, así como los costos de energía, su fácil procesamiento y recuperación de la biomasa microalgal (Fernández et al., 2012).

Finalmente, otro criterio importante es la (iv) selección de cepas autóctonas, este criterio facilitará no solo su obtención y aislamiento, sino que también favorece la



compatibilidad con las condiciones ambientales para su cultivo, respuesta a alteraciones del ambiente, se consideran variaciones de temperatura, disponibilidad de nutrientes y fuente lumínica, así como competencia con otras especies de microalgas o bacterianas (Singh et al., 2011).

Por todo lo anterior, la selección de la cepa representa un gran reto científico y tecnológico, ya que hace falta a nivel mundial, paquetes tecnológicos que incluyan medios y sistemas de cultivo, así como condiciones de crecimiento específicos para cada fenotipo de microalga con potencial para producir biomasa o biomoléculas específicas.

## **2.2 Condiciones de crecimiento de las microalgas: parámetros de cultivo**

Los parámetros o condiciones de cultivo están asociados a la búsqueda de condiciones que maximicen en primer lugar la producción de biomasa y por ende la generación de los compuestos de interés. Las condiciones de cultivo también favorecen metabólicamente la generación de las biomoléculas objetivo, es decir, la limitación en alguno de ellos tiene que ver con la modulación de su ciclo metabólico. Los parámetros de cultivo también dependen de la cepa de microalgas a utilizar y del sistema de cultivo que se emplee para el mismo.

En general, las microalgas dependen para su crecimiento de un suministro de carbono y de una fuente de luz para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, como respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento sus diversos tipos de metabolismo (Arias et al, 2013). Se ha demostrado que tanto el contenido de lípidos como el perfil de ácidos grasos de las microalgas varía no solo entre especies sino también en función de las condiciones del cultivo, entre las que se encuentran, la concentración de nutrientes, la calidad y cantidad de luz, la temperatura, el O<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub>, el pH, la salinidad y factores operacionales como mezclado y la edad del cultivo (Peralta et al, 2012; Arias et al, 2013; Bagchi et al, 2019; Daneshvar et al, 2020). Para que los procesos basados en microalgas sean sostenibles, factibles y económicamente viables, es necesario desarrollar tecnologías de cultivo con alta productividad de biomasa y/o biomoléculas de alto valor agregado al menor costo de producción (Manzoni et al., 2021).

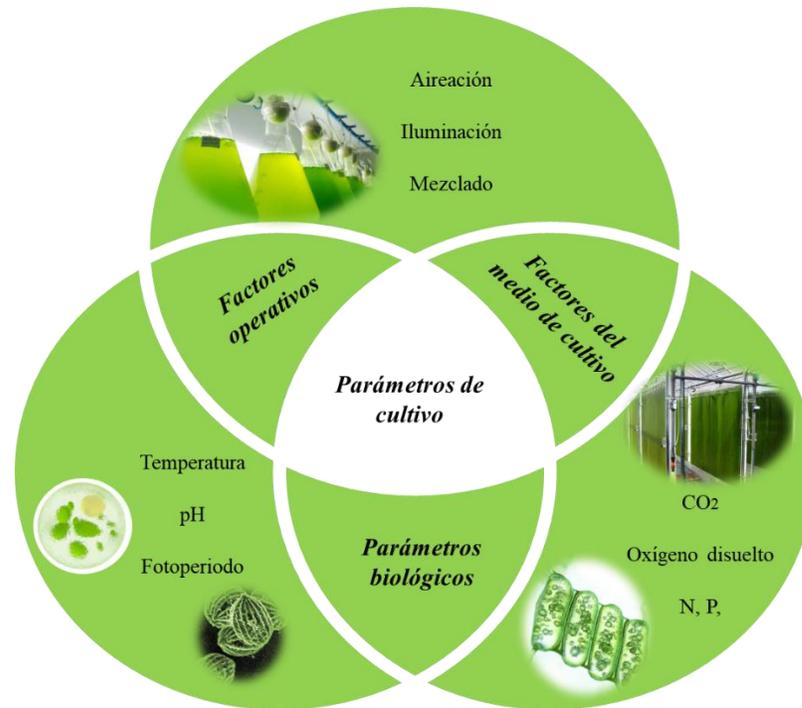


Figura 2. Factores de crecimiento de las microalgas.

### 2.2.1 Nutrientes

Además de luz y una fuente de carbono, las microalgas requieren para su crecimiento de otros nutrientes como el nitrógeno y fósforo, estos representan entre el 10 y 20% de la biomasa de las microalgas (Serejo et al., 2020). La biodisponibilidad de estos nutrientes regula la síntesis de algunos bioproductos de interés (Viruela et al., 2021). El nitrógeno ha sido demostrado como el principal regulador en el crecimiento y acumulación de lípidos (Xin et al., 2010). Las microalgas son capaces de crecer y sintetizar lípidos empleando diversas fuentes de nitrógeno, en función de la especie de microalga, ésta puede tener mayor o menor afinidad por las diversas formas de nitrógeno disponibles en el medio de cultivo (Yousuf, 2019). Las microalgas también requieren de fósforo, durante el metabolismo, el  $PO_4^{-3}$  es asimilado de las formas  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^-$  e incorporado dentro de compuestos orgánicos a través del proceso de fosforilación, en la cual gran parte del  $PO_4^{-3}$  es captado para la generación de adenosin trifosfato (ATP) a partir de adenosin difosfato (ADP), obteniendo así el suministro de energía celular (Beltrán et al. 2017).



Las aguas residuales son una buena fuente de los nutrientes necesarios para el cultivo de microalgas. Por lo tanto, la aplicación de efluentes orgánicos de las industrias alimentarias y agrícolas puede satisfacer la demanda de nutrientes en el cultivo de microalgas.

### 2.2.2 Fuente de carbono

Dependiendo del tipo de metabolismo utilizado por las microalgas para su crecimiento, la fuente de carbono puede ser orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras), o inorgánica ( $\text{CO}_2$ ). Fotoautotróficamente, las microalgas utilizan la luz como fuente de energía y el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis (Huang et al., 2010); heterotróficamente, las microalgas en ausencia de luz utilizan solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, (Chojnacka y Marquez, 2004); mixotróficamente, utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico (Chen et al., 2011). Las microalgas fotoautótrofas pueden fijar  $\text{CO}_2$  de tres fuentes diferentes: de la atmósfera, de los gases de la industria o en forma de carbonatos solubles como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$  (Wang et al., 2008). En algunos sistemas de cultivo suele suministrarse  $\text{CO}_2$ , sin embargo, este afecta los costos de producción, por lo que muchas investigaciones se han centrado en buscar estrategias de cultivo para la fijación de  $\text{CO}_2$  (Míguez et al., 2018, Ho et al., 2012), o bien utilizar fuentes generadoras de  $\text{CO}_2$ , principalmente en procesos de digestión anaerobia en biodigestores, aunque es necesario ampliar este campo de estudio. La adición de  $\text{CO}_2$  ha demostrado mejorar significativamente la productividad de biomasa.

### 2.2.3 Disponibilidad de luz / fotoperiodo

La disponibilidad de luz influye notablemente en la actividad fotosintética (Arias et al., 2013), esta influencia se ve reflejada en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios, por lo que su regulación permite modular condiciones de crecimiento óptimo, por lo que es necesario considerar su intensidad, su calidad espectral y la necesidad de establecer un fotoperiodo para favorecer así la acumulación de lípidos (Daneshvar et al., 2020).



El fotoperiodo tiene que ver con los ciclos de luz/oscuridad al que el cultivo está expuesto durante el periodo de crecimiento. La iluminación del sistema de cultivo puede ser suministrada por la incidencia de la luz solar o bien por iluminación artificial, la primera es la de menor costo, pero de menor eficiencia por los ciclos día/noche, así como la dependencia de las condiciones climáticas (Manzoni et al., 2021). Por otro lado, la iluminación artificial puede dar como resultado una tasa fotosintética mejorada y, por lo tanto, una mayor productividad de biomasa y la acumulación de productos específicos (Beigbeder & Lavoie, 2022). El fotoperiodo tiene una gran influencia en la síntesis de muchos compuestos de interés, por lo que la disponibilidad de luz o ausencia puede incidir en el rendimiento y producción de biomasa (Viruela et al., 2021).

Una alta eficiencia fotosintética en cultivos de microalgas es fundamental para producir biocombustibles a precios asequibles (Moreno et al., 2017). Las actuales investigaciones centran sus objetivos en buscar condiciones ambientales favorables para la incidencia de la luz, tal es el caso de la búsqueda de geometrías y ubicaciones específicas para los sistemas de cultivo, de tal manera que se optimice la eficiencia lumínica (Manzoni et al., 2021, Maroneze et al., 2016). Tanto las intensidades de luz como el ciclo del fotoperíodo pueden influir en el rendimiento de la biomasa, un estudio realizado Beigbeder & Lavoie, 2022 demostró que los períodos de iluminación más largos presentaron el mayor crecimiento de algas y respuestas de captura de CO<sub>2</sub>. Dentro de los sistemas de iluminación artificial más utilizados se encuentra la luz fluorescente y la luz LED, dentro de estas, las luces LED producen un estrecho rango espectral, que son más compatibles con las bandas de absorción de los pigmentos fotosintéticos de las microalgas (Hsieh et al., 2019).

Por otro lado, la alta productividad de biomasa puede producir fotoinhibición, disminuyendo la eficiencia de la iluminación, esta problemática se puede atender de dos formas, la primera es que el diseño y geometría del sistema de cultivo permita la exposición uniforme del medio y la otra es que se incorporen procesos de mezclado al sistema (Daneshvar et al., 2021). Existe un mínimo de luz requerido para realizar el proceso fotosintético, conocido como irradiancia de compensación, por debajo de este valor, las microalgas están bajo fotolimitación, lo cual ocurre cuando no hay luz suficiente y se produce



la respiración. Por encima de este valor de compensación, la tasa de asimilación fotosintética aumenta con la irradiancia hasta alcanzar el punto de saturación de la luz (Manzoni et al., 2021). Como se ha descrito con anterioridad, el uso de luz artificial favorece la eficiencia fotosintética, sin embargo, su desventaja es que eleva los costos de producción.

#### 2.2.4 Aireación del cultivo

La agitación o aireación de los cultivos de microalgas es necesaria para evitar la sedimentación celular y para asegurar su exposición uniforme a la luz y a los nutrientes, además de que favorece el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el medio externo (Moreno et al., 2017; Fernández et al., 2012). Un mezclado inadecuado, reduce la productividad de biomasa y puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo (Peralta et al., 2012).

La aireación proporciona una distribución uniforme de nutrientes, aire y CO<sub>2</sub> en el cultivo de microalgas. También permiten la penetración y distribución uniforme de la luz dentro del cultivo (Assucao & Malcata, 2020; Leite et al., 2020). Los sistemas de mezcla/recirculación más empleados en los sistemas de cultivo son de tipo bombeo, agitación mecánica y transporte aéreo, en el que se rocía o burbujea aire o gas enriquecido con CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.5 Temperatura del medio

La temperatura es otra de las variables importantes en el proceso, puesto que no controlarla puede llegar a tener un efecto nocivo sobre el cultivo; afectando la composición, la velocidad de crecimiento, etc. (Fajardo & Londoño, 2020). Las microalgas son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura, la mayoría de ellas son mesófilas, aunque generalmente varía con la especie, siendo el rango de cultivo de entre 28°C y 35°C, sin embargo, algunas especies pueden crecer en condiciones extremas de temperatura, como cepas termófilas y psicrófilas (Manzoni et al., 2021, Park et al., 2011). La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie, por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global (Hernández & Labbé, 2014).



El cultivo de microalgas en sistemas cerrados expuesto a las condiciones ambientales puede tener ciertas limitaciones en cuanto al control de la temperatura, esta problemática se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, etc. (Huancollo, 2018). Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto el control de la temperatura suele ser complicado, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos transparentes, o bien, proveer dentro del diseño sistemas de enfriamiento y calefacción (Grández et al., 2020; Park et al., 2011). En ambos casos, el control de la temperatura representa el incremento en los costos de producción.

#### 2.2.6 pH del medio de cultivo

Durante el crecimiento de las microalgas el pH suele ser un indicador importante, está influenciado por varios factores, tales como, la especie de microalga, la mayoría de las especies crecen en un pH neutro, a excepción de las marinas, que prefieren valores de pH de entre 8.0 y 8.5, es posible encontrar especies extremófilas, como *Spirulina platensis*, que puede tolerar hasta pH 9, y *Galdieria sulphuraria*, que puede tolerar pH por debajo 2 (Manzoni et al., 2021, Khan et al., 2018; Hernández & Labble, 2014). De forma que, por encima o por debajo del pH óptimo para cada especie se puede disminuir la productividad de biomasa (Assuncao & Malcata, 2020).

Otro factor que afecta el pH es la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, así como la disponibilidad o usencia del CO<sub>2</sub> (Assuncao & Malcata, 2020; Khan et al., 2018). Por otra parte, el pH es una de las condiciones ambientales más críticas en el cultivo de microalgas, ya que determina la solubilidad y disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el cultivo e influye en el estado fisiológico de las células. Por lo tanto, el pH puede controlarse con el suministro automatizado de inyección de CO<sub>2</sub>, o bien a través de la adición de ácidos o bases según la necesidad del cultivo (Berenguel et al. 2004, Martínez 2008, Sialve et al. 2009).

#### 2.2.7 Oxígeno disuelto

Durante el proceso fotosintético, las microalgas al igual que las plantas producen oxígeno, la reacción de fotosíntesis produce estequiométricamente 1.9 toneladas de oxígeno cuando se genera 1 tonelada de biomasa de microalgas (Manzoni et al., 2021). Esta

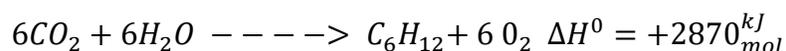


productividad de oxígeno resulta benéfica en términos ambientales en la bioconversión de CO<sub>2</sub>, sin embargo, en los sistemas de cultivo cerrados, es necesario establecer un proceso para eliminarlo del medio, ya que su acumulación puede inducir la fotorespiración, reduciendo así la eficiencia fotosintética (Assuncao & Malcata, 2020). Por lo tanto, un aspecto crítico del diseño y escalado de fotobiorreactores tubulares es establecer geometrías que no permitan la acumulación de oxígeno a niveles inhibitorios (Olivieri & Salatino et al., 2014).

Además de los factores mencionados anteriormente, la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo y su edad, afectan también el contenido y composición de los ácidos grasos de la biomasa (Peralta et al., 2012). Generalmente el contenido de lípidos de las microalgas durante la fase exponencial de crecimiento es menor o igual a 15 % en base seca, porque estos compuestos solo se acumulan cuando las células están bajo condiciones de estrés fisiológico, lo cual generalmente está asociado a condiciones de limitación de nutrientes (Li *et al.*, 2008). La cosecha de la biomasa en la fase estacionaria de crecimiento, incrementan el contenido de lípidos y disminuyen el número de insaturaciones de los ácidos grasos que lo conforman (Arias et al, 2013).

### 2.3 Metabolismo de las microalgas para la síntesis de lípidos

La mayoría de las microalgas acumulan lípidos bajo condiciones ambientales específicas. Se ha observado que el contenido de lípidos es mayor en la fase estacionaria de crecimiento que en la fase exponencial (Arias et al., 2013). Comprender el metabolismo de los lípidos y cómo se controla durante el crecimiento de algas es de gran importancia para maximizar la producción de lípidos. Las microalgas transforman el CO<sub>2</sub> en biomasa, mediante el proceso de fotosíntesis a partir de la siguiente reacción de síntesis:



Durante la fotosíntesis, el CO<sub>2</sub> se convierte en glicerato-3-fosfato (G3P). Esta molécula es precursora de varios materiales de almacenamiento, como polisacáridos y



lípidos. La conversión de G3P en piruvato y luego en acetil-CoA se da a través de una reacción catalizada por el complejo de piruvato deshidrogenasa (PDC), iniciando la ruta biosintética de lípidos, que se produce en el plastidio. La acetil-CoA también se puede generar a través de la vía bioquímica que permite la conversión de polisacáridos en lípidos (Bellou y Aggelis, 2012), vía que comúnmente utilizan los heterótrofos oleaginosos durante la asimilación del azúcar (Bellou et al., 2014). La descomposición de los polisacáridos de almacenamiento (que ocurre, por ejemplo, bajo limitación de luz) generalmente genera energía a través de la glucólisis que ocurre en el citosol seguida por el ciclo del ácido cítrico que ocurre en la mitocondria. Sin embargo, se ha demostrado que, en condiciones críticas, como la limitación de nutrientes como el nitrógeno o fosfato puede alterar el ciclo del ácido cítrico (es decir, inhibiendo la  $\text{NAD}^+$ -isocitrato deshidrogenasa) que conduce a la acumulación de citrato en la mitocondria y posteriormente a su excreción en el citosol (Makri et al., 2010; Bellou et al., 2012, 2014).

La citratoliasa citosólica dependiente de ATP convierte el citrato en oxaloacetato y acetil-CoA; este último se convierte en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa citosólica (ACC) y se vuelve disponible para la elongación de ácidos grasos en las membranas del retículo endoplásmico (RE) (Mühlroth et al., 2013). La síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga requiere la presencia de elongasas y desaturasas específicas, que actúan principalmente sobre los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Bellou et al., 2014). La elongasa de ácidos grasos es un complejo que consta de cuatro subunidades, a saber,  $\beta$ -cetoacil-CoA sintasa (KCS),  $\beta$ -cetoacil-CoA reductasa,  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidratasa y enoil-CoA reductasa, que son similares a las que se encuentran en el tipo II FAS identificado en *C. reinhardtii* (Baba y Shiraiwa, 2013; WL Yu et al., 2011). En el plastidio, los ácidos grasos se utilizan para producir ácido lisofosfatídico y ácido fosfatídico (PA) a través de la acción de las aciltransferasas plastidiales. El PA y su producto derivado diacilglicerol (DAG) pueden actuar como precursores para la síntesis de lípidos estructurales de la membrana plastidial (Fan et al., 2011; Ohlrogge y Browse, 1995).

A pesar de las importantes aplicaciones biotecnológicas, las microalgas no se han estudiado completamente en términos de su bioquímica. Por lo tanto, la biosíntesis y



modificación de ácidos grasos y el catabolismo de lípidos no se han aclarado para las microalgas como lo han hecho para las plantas y los microorganismos heterótrofos (Beer et al., 2009; Boyle et al., 2012; Khozin-Goldberg y Cohen, 2011; Moellering et al., 2010; Moseley et al., 2009). Especialmente, la ruta general de biosíntesis de lípidos y sus reguladores no se han descrito claramente, los esfuerzos para mejorar la acumulación de lípidos en las microalgas se han centrado principalmente en incrementar la producción mediante la modificación de la expresión de enzimas clave implicadas en la síntesis; sin embargo, a menudo presentan deficiencias, por lo que aún se requiere comprender los mecanismos físicos, químicos y biológicos que favorecen la acumulación de lípidos.

#### **2.4 Sistemas de cultivo para microalgas**

Para la producción de biomasa microalgal se disponen de dos principales sistemas de cultivo, los abiertos y cerrados. Sin embargo, actualmente no existe un sistema que se adapte a todos los procesos sin que se presenten algunas limitaciones. Tomando en cuenta este aspecto, las actuales investigaciones están orientadas en la búsqueda de sistemas altamente eficientes y de bajo costo de operación (Assuncao & Malcata, 2020). Para la elección de un sistema de cultivo se deben tener en cuenta diversos criterios, primeramente, la finalidad de su cultivo, es decir, las biomoléculas de interés en la biomasa; la tolerancia de las cepas de microalgas a variaciones ambientales o condiciones del sistema de cultivo; el metabolismo de las especie microalgal, esto permitirá elegir un sistema que se adapte a las necesidades metabólicas de la cepa; otro criterio importante es la escala del sistemas de cultivo, y finalmente, el costo/beneficio del sistema, en términos de productividad respecto al costo de operación y mantenimiento (figura 3) (Chew et al., 2017).

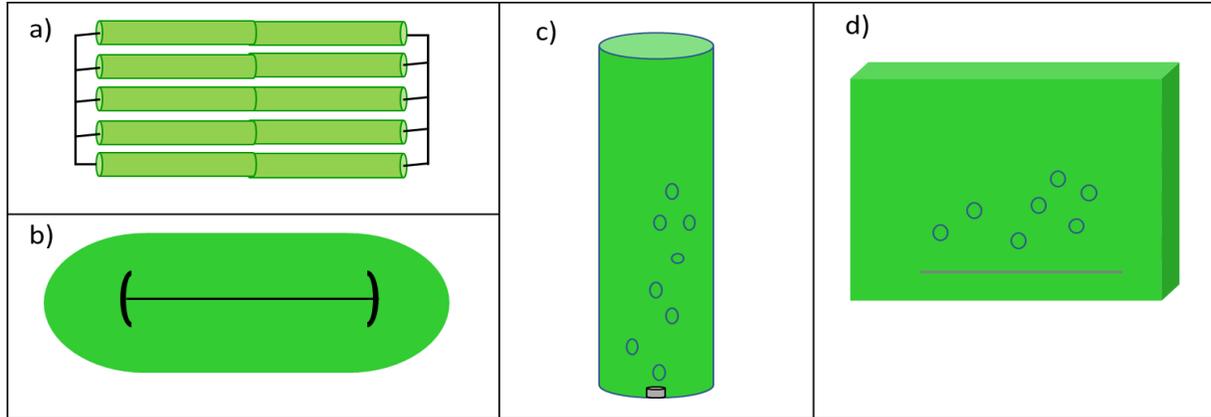


Figura 3. Sistemas convencionales de cultivo de microalgas a) FBR tubular, b) raceway, c) FBR de columna, d) FBR de placa plana.

#### 2.4.1 Sistemas abiertos

Los sistemas abiertos son los más utilizados a escala industrial para la producción de biomasa microalgal, dentro de estos sistemas se pueden clasificar en aguas superficiales naturales, como estanques, lagunas y lagos, y en estanques artificiales. Para su funcionamiento requieren de la luz solar, agua y  $\text{CO}_2$ .

Dentro de los sistemas abiertos más utilizados se encuentran los raceways (Barceló et al., 2022; Morillas et al., 2021), los cuales son estanques de carrusel o canales de circuito cerrado, elaborados a partir de diversos materiales, principalmente, concreto, membrana plástica o fibra de vidrio. Estos sistemas están provistos de un sistema de mezclado y aireado impulsado por una paleta, hélice o inyector de aire (Inostroza et al., 2021). El suelo y las paredes suelen estar recubiertos por una capa de plástico inerte. Debido a la poca profundidad las microalgas absorben con facilidad el  $\text{CO}_2$  atmosférico.

Otra característica de los sistemas abiertos es que pueden trabajar de forma continua o intermitente, suelen construirse de una profundidad no mayor a 30 cm, para favorecer la eficiencia solar. La poca profundidad del sistema reduce la productividad por unidad de área, por lo que se suelen instalar varios sistemas para producir una gran cantidad de biomasa, esto se traduce en mayor espacio para la instalación y limita la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  ya que tiende a liberarse a la atmósfera (Barceló et al., 2022; Kraai & Rorrer, 2022). Dentro de su



diseño se debe considerar la medición y el control de parámetros como el pH, la luz y agitación para permitir la homogeneización del cultivo (Assunçao y Malcata, 2020).

Como ocurre con cualquier reactor biológico, la productividad depende de variables diversas, como la configuración geométrica, las especies de microalgas y las condiciones de funcionamiento y cultivo (Assuncao & Malcata, 2020; Manzoni et al., 2021), siendo la temperatura y la iluminación las variables menos controladas durante el proceso. Debido a sus características de operación, la temperatura en este tipo de reactores no se puede controlar mediante máquinas de frío y calor convencionales, ya que suponen un mayor gasto económico y energético (Hernández et al., 2022). Algunos diseños actuales han propuesto la incorporación de un intercambiador de calor como fuente de calor y como estrategia para mantener una alta productividad durante todo el año (Ryu et al., 2019). Otras estrategias consideran el uso o incorporación de espejos externos para reflejar la luz solar adicional sobre el cultivo y aumentar el flujo solar incidente en momentos críticos del día y del año (Hoeniges et al., 2022).

Por otro lado, este tipo de sistemas ha mostrado de acuerdo a diversas investigaciones que su costo de producción es 50 a 80% más bajo que los sistemas cerrados, por lo que a pesar de las limitantes que presentan siguen siendo el sistema económicamente más viable para la producción de biomasa a nivel industrial (Del Olmo et al., 2021; Manzoni et al., 2021). Los raceways son altamente utilizados a nivel industrial debido principalmente a su simplicidad, flexibilidad, fácil ampliación, y bajos costos de construcción y operación (Morillas et al., 2021).

#### 2.4.2 Sistemas cerrados

Los sistemas de cultivo cerrados también llamados fotobiorreactores (FBRs), son sistemas de cultivo que permiten controlar la mayoría de los factores de crecimiento, como la temperatura, el pH e iluminación; por lo tanto, es posible cultivar por periodos prolongados una especie de microalga, sin riesgo de contaminación (Assuncao & Malcata, 2020). Un fotobioreactor es un contenedor biológico artificial cuyo ambiente interno es capaz de generar las condiciones necesarias para que la fotosíntesis de las clorofilas existentes en microorganismos, células o tejidos fotosintéticos que en ellos se cultiva, crezca y se



desarrollen de manera rápida y eficiente para generar biomasa y los productos metabólicos que se generen. En este sentido, el término fotobiorreactor se refiere a sistemas cerrados para el medio ambiente externo; es decir, que no tienen intercambio directo de gases y contaminantes con el medio ambiente externo.

En comparación con los cultivos abiertos tienen costos de construcción y operación mucho mayor; sin embargo, pueden superar los principales inconvenientes de los sistemas abiertos, al requerir menos superficie para su instalación y mejor control de los parámetros de cultivo (Sirohi et al., 2022).

Los diseños de sistemas comunes para el cultivo de microalgas presentan deficiencias importantes con respecto al control de los parámetros de crecimiento y procesamiento (Assunção y Malcata, 2020), en respuesta a estas limitaciones se han desarrollado sistemas de cultivos en fotobiorreactores, la mayoría de ellos plantean desafíos para el uso práctico, a pesar de una serie de ventajas, ya que deben considerarse ciertos parámetros que afectan su rendimiento, los diseños más comunes se presentan a continuación.

#### 2.4.2.1 Fotobiorreactores tubulares

Los fotobiorreactores tubulares consisten en una serie de tubos de plástico, policarbonato o vidrio transparentes rectos, estos materiales ofrecen resistencia, transparencia y durabilidad (Molina et al., 2011), se pueden organizar en diferentes patrones y con diferentes orientaciones (Maroneze & Queiroz, 2018). Este arreglo de tubos se conoce como receptor solar, y es donde la luz del sol se captura, los diámetros de los tubos normalmente son menores a 0.1 m. Los valores de diámetro recomendados oscilan entre 0.03 y 0.12 m, a mayor diámetro se propicia la fotolimitación del cultivo y a menores diámetros se eficientiza el suministro de luz y por ende la eficiencia fotosintética (Assuncao & Malcata, 2020). Esto se debe principalmente a que cuando la densidad de un cultivo aumenta, la luz del sol no penetra profundamente, lo cual se necesita para asegurar una alta productividad de biomasa (Velásquez, 2010).

La aireación del sistema se da mediante una columna de burbujeo o bien mediante airlift, impulsado por una bomba que suministra aire y a la vez facilita el intercambio gaseoso, la distribución de nutrientes, además de evitar la sedimentación de la biomasa (Sirohi et al.,



2022). Este tipo de sistemas son adecuados para especies con necesidades específicas de cultivo o con susceptibilidad a la contaminación (Pereira et al., 2018).

Una de las principales ventajas de este sistema es la superficie de cultivo y su alta productividad, además del control de las condiciones de cultivo. Sin embargo, la modulación de las condiciones de cultivo se traduce en altos costos de operación, representando una desventaja para su escalamiento (Assuncao & Malcata, 2020; Sirohi et al., 2022, Barceló et al., 2022). Por lo que las tendencias de investigación sobre estos sistemas están enfocadas en la búsqueda de diseños que optimicen el uso de la luz, geometrías que mejoren el aprovechamiento de la misma, así mismo, se buscan mecanismos para la eliminación del oxígeno disuelto, para ello se han propuesto colectores y serpentines (Acién et al., 2020). Aunque tienen varios desafíos tecnológicos, la principal limitación a escala comercial de los FBRs tubulares es el costo de inversión, que puede exceder el doble del monto reportado para los sistemas a base de canales.

Las actuales investigaciones están centradas en el diseño de sistemas que optimicen la distribución de la luz para promover la tasa de crecimiento de la biomasa y la transferencia de masa, dentro de estos, destacan diseños con paredes cóncavas para generar un campo de flujo rotacional del medio de cultivo, los cuales han demostrado un aumento en la tasa de crecimiento de la biomasa (Daneshvar et al., 2021; Kumar et al., 2022). Así mismo, se propone el uso de simulación de dinámica de fluidos computacional (CFD) para monitorear y controlar los parámetros de cultivo, principalmente los parámetros hidrodinámicos del cultivo (Yaqoubnejad et al., 2021).

#### 2.4.2.2 Fotobiorreactores planos

Los fotobiorreactores planos o de placa plana son sistemas que presentan una forma cúbica, con dos amplias superficies planas, ideales para cultivo en interiores como para exteriores (Assuncao & Malcata, 2020), se caracterizan además por presentar iluminación por ambos lados de la placa. Los materiales utilizados para este tipo de sistemas son generalmente de material transparente, como vidrio, plexiglás o policarbonato.

Por lo general tienen mezcla por aireación, aunque en algunos casos puede ser con una bomba e incluir algún sistema de refrigeración. La relación superficie/volumen de estos



fotobiorreactores es muy grande, por lo que proporcionan una gran captación de luz, su versatilidad en cuanto a la orientación permite encontrar la orientación más favorable para favorecer la exposición a la luz. Debido a esto, trabajan bajo el concepto de alta relación área/volumen con el fin de aprovechar de forma óptima la energía solar o la iluminación artificial (Weiss & Schebek, 2021). Esta configuración cuenta con una serie de ventajas que se ven representadas en altos rendimientos; cuenta con una unidad de transferencia abierta que es efectiva para evitar o prevenir la acumulación de oxígeno; a pesar de ello, tal condición promueve el contacto con el entorno de manera que el medio es totalmente susceptible a contaminarse por agentes externos (Guieysse & Plouviez, 2021). Este sistema de cultivo es relativamente de bajo costo; sin embargo, pueden surgir dificultades en términos del mantenimiento de la temperatura (Sirohi et al., 2022).

Algunas de las desventajas que presenta este sistema, están relacionadas con su escalamiento, ya que el tamaño de estos sistemas puede variar, pero se recomiendan alturas inferiores a 1.5 m, con una anchura inferior a 0.10 m, por lo que el escalado se convierte en una limitación crítica, ya que se requieren de muchos módulos para una instalación comercial y por tanto se requiere una amplia área para su instalación (Daneshvar et al., 2021).

Otro aspecto es que por su diseño plano existe el riesgo de presentarse fotoinhibición, especialmente en cultivos al aire libre o en etapas tempranas de crecimiento, las células se inhiben debido a la sobresaturación de luz; esto puede afectar gravemente los sistemas fotosintéticos y el metabolismo celular, ocasionando la productividad de la biomasa (Assuncao & Malcata, 2020).

Dentro de los parámetros clave a considerar en el establecimiento de cualquier tipo de biorreactor se encuentra la trayectoria de la luz, la cual debe ser pequeña (2,5cm), mantener una alta densidad celular (>8-15g/l), un mezclador vigoroso para asegurar ciclos luz/oscuridad (L/O) de alta frecuencia, utilizar tramos cortos de tubería (20- 30m) para evitar inhibición del crecimiento por acumulación de O<sub>2</sub>, evitar la acumulación de sustancias inhibitorias y mantener temperatura y pH óptimos (Contreras et al., 2003).

Las actuales investigaciones están centradas en el diseño de sistemas que optimicen la distribución de la luz para promover la tasa de crecimiento de la biomasa y la transferencia



de masa, dentro de estos, destacan diseños con paredes cóncavas para generar un campo de flujo rotacional del medio de cultivo, los cuales han demostrado un aumento en la tasa de crecimiento de la biomasa (Daneshvar et al., 2021; Kumar et al., 2022). Así mismo, se propone el uso de simulación de dinámica de fluidos computacional (CFD) para monitorear y controlar los parámetros de cultivo, principalmente los parámetros hidrodinámicos del cultivo (Yaqoubnejad et al., 2021).

Con el objetivo de resolver los problemas de los fotobiorreactores convencionales, se han propuesto otros tipos de fotobiorreactores, los cuales varían en función de su diseño y geometría, hidrodinámica, el medio de cultivo, la distribución de la luz y aplicaciones técnicas para favorecer la productividad de biomasa (Assuncao & Malcata, 2020). Dentro de estos se encuentran los sistemas híbridos, que combinan dos o más configuraciones de varios sistemas. Dentro de estas mejoras se han combinado FBR de placa plana y tubulares, obteniendo un mejor régimen de flujo y menores costos operativos y de materiales (Vo et al., 2019). Un diseño propuesto por Xu et al. (2020), acopló un sistema de cultivo híbrido estanque-tubular, en el que se logró mejorar el rendimiento de biomasa de microalgas en un 31.2% en comparación con los estanques tradicionales (tabla 2).

En los sistemas de placa plana se ha propuesto mejoras en el diseño y geometría, desde placas con inclinaciones diversas, en forma de domo, en forma de V (Olivieri et al., 2014). Sobre las mejoras en sus sistemas de funcionamiento, destaca la incorporación de deflectores y la incorporación del sistema de aireación airlift (Daneshvar et al., 2020). Estas mejoras tienen características particulares que favorecen una alta relación superficie-volumen o bien un adecuado mezclado para eficientizar la transferencia de masa en el sistema.

Tabla 2. Comparación de los sistemas de cultivo convencionales de microalgas y sus productos obtenidos por diversas microalgas.

Sistema de cultivo	Especie cultivada	Principales productos	Status	Escalamiento	Consumo de energía	Control de parámetros de crecimiento
Raceways	<i>Chlorella vulgaris</i>	Biodiesel Biometanol	Comercial	Fácil	Bajo	Bajo
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Biodiesel				
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Biodiesel Biogás				
	<i>Spirulina platensis</i>	Biodiesel				
	<i>Botryococcus braunii</i>	Hidrocarburos				
	<i>Dunaliella salina</i>	β-Caroteno				
	<i>Scenedesmus acutus</i>	Bioplástico				
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Biodiesel Aceite				
FBR tubular	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Biodiesel Biomasa	Comercial	Fácil	Alto	Alto
FBR placa plana	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Escala piloto	Difícil	Justo	Alto
	<i>Tetraselmis suecica</i>	Compuestos bioactivos				
FBR de columna	<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasa	Escala piloto	Difícil	Alto	Alto
	<i>Scenedesmus acutus</i>	Bioplástico				

(Guieysse y Plouviez, 2021; Manzoni et al., 2021)

Dentro de los FBR tubulares se ha buscado diversificar la geometría y los diseños, destacan los modelos helicoidales y cónicos, sobre las mejoras en sus condiciones de cultivo se incluyen la incorporación de mezcladores estáticos (Assuncao & Malcata, 2020). Estas mejoras permiten mejorar la relación sustrato / volumen, así como maximizar la captura de luz, son adecuados para uso en exteriores con luz solar o bien en interiores bajo luz artificial (Koller, 2015).

En los fotobiorreactores de columna, las propuestas mejoradas están relacionadas con incrementar la eficiencia fotosintética, por lo que las tendencias de diseño proponen sistemas de mezclado y aireación airlift, además de mejorar el sistema de iluminación a través de la



disminución de la trayectoria de luz, mejora de los ciclos de luz/oscuridad, hidrodinámica y tasas de transferencia de masa; por ejemplo, la introducción de deflectores horizontales o la disposición de flujos giratorios combinado con el transporte aéreo (Daneshvar et al., 2021; Assuncao & Malcata, 2020; Vo et al., 2029). A pesar del potencial que tienen estas tecnologías en términos de productividad de biomasa microalgal, es necesario evaluar su escalamiento a nivel industrial y su impacto ambiental (Manzoni et al., 2021).

## **2.5 Medios de cultivo para microalgas**

Los medios de cultivo son soluciones que contienen micro y macronutrientes necesarios para el metabolismo de las microalgas, la síntesis de la gran variedad de bioproductos están relacionados con la disponibilidad de los nutrientes (Daneshvar et al., 2021). Las microalgas poseen mayores tasas de crecimiento y productividad en comparación con los cultivos agrícolas. Sin embargo, se requieren grandes cantidades de agua para su cultivo, esta desventaja puede omitirse con el uso de agua de mar y aguas residuales como medios de cultivo alternativos y de bajo costo (Bui et al., 2022; Peralta et al., 2012).

### **2.5.1 Medios de cultivo sintéticos**

Los medios de cultivo sintéticos son caldos con concentraciones recomendadas de micro y macronutrientes. Estos medios han sido ampliamente probados para el cultivo de diferentes especies de microalgas, dentro de estos medios se encuentran el medio F/2 desarrollado por Guillard (1975), BBM (Bold's Basal Medium) y BG11 (Blue- Green), cada medio sintético viene con instrucciones específicas que incluyen los nombres de los componentes de la formulación y sus concentraciones (Polat et al., 2020).

Sin embargo, el uso de medios de cultivo sintéticos es una limitante en la producción comercial de la biomasa microalgal debido a los altos costos. En los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de medios de cultivo de bajo costo, los cuales incluyen el uso de aguas residuales o lixiviados, o bien la reformulación de los medios de cultivos sintéticos.

### 2.5.2 Aguas residuales como medio de cultivo

Las aguas residuales enriquecidas con nutrientes son otra opción gratuita y de bajo costo. Las aguas residuales se caracterizan por contener una gran variedad de nutrientes entre ellos, altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P). Debido a la gran variedad de aguas residuales disponibles, es necesario realizar una caracterización físico-química que permita conocer los macro y micronutrientes presentes, principalmente las concentraciones de N, P y carbono (C) (Brar et al., 2022). Aunque las microalgas pueden crecer bajo condición mixotrófica, también se debe evaluar la viabilidad de utilizar estos medios de cultivos en cepas específicas, ya que cada especie puede asimilar de forma distinta los nutrientes, tomando en cuenta también que estos medios suelen tener condiciones de acidez y carga microbiológica alta (Martínez et al., 2022). En este sentido, varios tipos de aguas residuales agrícolas e industriales han sido analizadas para el cultivo de numerosas especies de microalgas marinas y de agua dulce (Ding et al., 2020; Daneshvar et al., 2021).

### 2.5.3 Uso de lixiviados como medio de cultivo

Los lixiviados son líquidos obtenidos a partir de la degradación biológica de la materia orgánica, posee una composición variada de macro y micronutrientes, ya que depende de su fuente de obtención. Los lixiviados son considerados un problema ambiental, ya que se escurren por el subsuelo, hasta llegar a los cuerpos de agua donde ocasionan eutrofización. Por lo que su gestión y desecho representa un reto importante, además de macro y micronutrientes pueden contener componentes metálicos y electrónicos, antibióticos, etc. (Martínez et al., 2022). La capacidad metabólica de las microalgas les permite crecer en medios con estas características, por lo que son una opción viable para biorremediar los lixiviados y a la vez obtener biomasa, con compuestos de alto valor para la industria (Grabska et al., 2015) (figura 4).

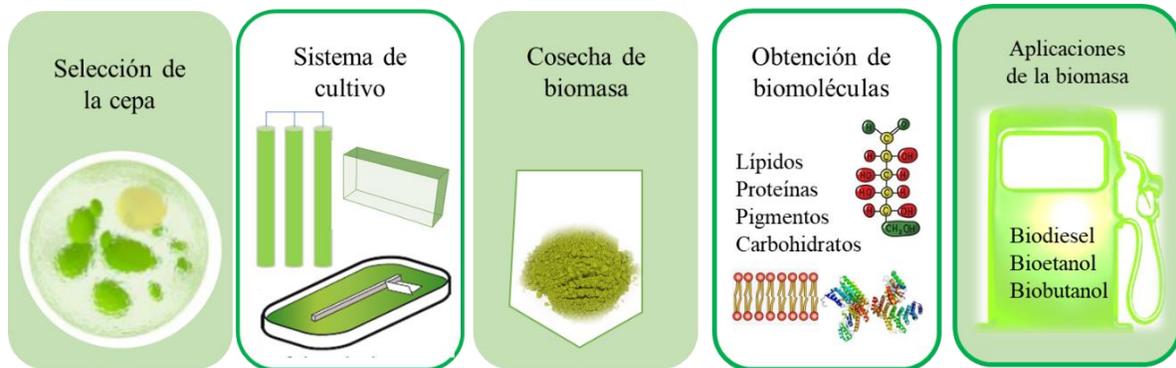


Figura 4. Etapas del cultivo de las microalgas.

## 2.6 Producción de biodiesel a partir de biomasa microalgal

El biodiesel se define como ésteres de mono alquilo, constituidos por cadenas largas de ácidos grasos (C14 - C22) derivados de los aceites vegetales o animales como resultado de su transesterificación, o por esterificación directa de los ácidos grasos, por medio de una gran variedad de alcoholes mono o polihídricos (Riveros y Molanos, 2006). El biodiesel ha sido ampliamente estudiado como combustible sustituto del diésel de petróleo, su uso puede ser puro o mezclado con diésel derivado del petróleo y suele emplearse en cualquier motor diésel con poca o ninguna modificación y no requiere nueva infraestructura de abastecimiento (Demirbas, 2009).

El uso de biodiesel como recurso energético resulta atractivo porque se deriva de una fuente renovable que podría ser suministrada de manera sostenible (Huang et al., 2010), por lo que disminuye la dependencia al petróleo y presenta diferentes ventajas frente al diésel como que es biodegradable y menos tóxico (Miao y Wu, 2006; Xue et al., 2006), además no contiene compuestos aromáticos, tiene un perfil más favorable de gases de combustión (tal como una baja emisión de monóxido de carbono, azufre, partículas en suspensión e hidrocarburos sin quemar) (Halek et al., 2009; Widjaja et al., 2009; Huang et al., 2010); su punto de ignición es relativamente alto (150 °C) lo que lo hace menos volátil y más seguro de transportar o manejar; su número de cetano es mayor; lo que otorga ventajas al proceso de combustión (Arias et al., 2013).

En función de la capacidad metabólica las microalgas sintetizan lípidos, su producción está determinada por los parámetros y sistemas de cultivo, como se observa en la tabla 3, el contenido de lípidos varía también entre especies de microalgas, se ha reportado un rendimiento de lípidos entre el 20 y 50 % en peso seco de la biomasa. Se han identificado aproximadamente 35 000 especies de microalgas con potencial para producción de biodiesel (Cheirsilp et al., 2020), se estima alrededor de 8000 especies de algas verdes pertenecientes al grupo de las *Chlorophyceae* las cuales destacan por su almacenamiento de almidón y triacilgliceroles principalmente (Khan et al.,2009).

Tabla 3. Contenido de lípido producidos por algunas especies de microalgas.

<b>Autor</b>	<b>Microalga evaluada</b>	<b>Contenido de lípidos</b>
Xu et al. (2006)	<i>Chlorella protothecoides</i>	55.2%
Ding et al. (2020)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	41.08%
Tan y Lin (2011)	<i>Scenedesmus rubescens</i>	39%
Mandal y Mallick (2009)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	13-43%
Ho et al. (2010)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-39%
Bagchi et al. (2019)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-40%
Sánchez et al. (2020)	<i>Verrucodesmus verrucosus</i>	50%
Xin et al. (2010)	<i>Scenedesmus</i> sp.	14-53%
Rodolfi et al. (2009)	<i>Scenedesmus</i> sp.	21% - 30%
Lin y Lin (2011)	<i>Scenedesmus rubescens</i>	43%
Shen et al. (2009)	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31%
Srinuanpan et al. (2018)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	33%
Toledo et al. (2018)	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	52%

La biomasa de las microalgas cultivada en estanques abiertos o los fotobiorreactores cerrados comúnmente alcanzan relativamente bajas concentraciones en el rango de 0.5-5 g/L (Lam y Lee, 2012).

## 2.7 Transesterificación de ácidos grasos

Los lípidos extraídos de la biomasa microalgal puede transformarse en ésteres a partir de diversos procesos, sin embargo, el método más común para obtener biodiesel es la transesterificación también llamada alcoholisis. En la transesterificación, los triglicéridos reaccionan con un alcohol, y usualmente la reacción es catalizada por bases, ácidos o enzimas (Plata et al, 2009), los productos de esta reacción son el biodiesel y la glicerina (figura 5).

La transesterificación consiste en la reacción de un triéster de glicerilo (triglicérido) con un alcohol para formar alquil ésteres y glicerol (Plata et al, 2009). El mecanismo de la reacción de transesterificación por catálisis heterogénea tiene principios similares a los establecidos en la catálisis homogénea de sistemas ácidos o básicos, el cual se fundamenta en las características nucleofílicas y electrofílicas del grupo carbonilo de los triacilglicéridos y del alcohol (Endalew et al., 2011). En la catálisis homogénea básica el factor importante es producir un alcóxido nucleofílico a partir del alcohol que luego ataque la parte electrofílica del grupo carbonilo (Ortega et al., 2014). La ruptura de los triglicéridos requiere de tres pasos: en el primero, se forma un intermediario tetraédrico debido al ataque nucleofílico del alcóxido al carbono electrofílico del grupo carbonilo. En el segundo paso, el intermediario se descompone formando un ion diacilglicérido y el éster alquilico del ácido graso. En el último paso se recupera el catalizador por transferencia de un protón. Estos pasos se repiten hasta formar los tres ésteres de ácidos grasos y glicerina (Ortega et al., 2014).

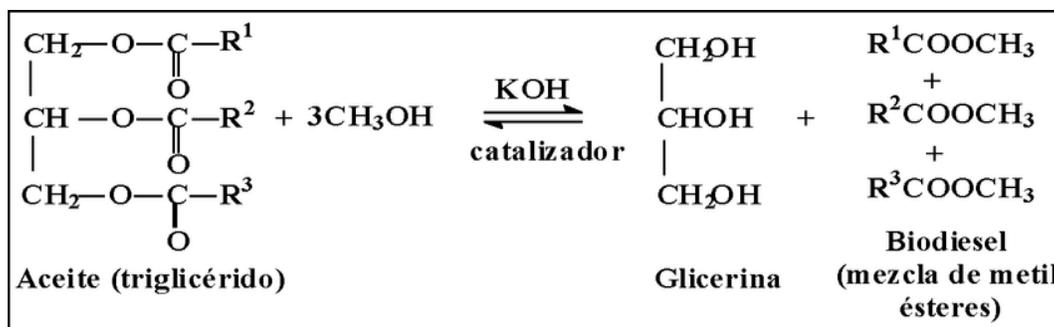


Figura 5. Reacción de transesterificación de ácidos grasos provenientes de microalgas.



El proceso de transesterificación es sensible a diversos parámetros; los más influyentes sobre la conversión de los triglicéridos en biodiesel son el tipo de alcohol, la relación molar alcohol/aceite, la cantidad de catalizador, la temperatura de reacción y la velocidad de agitación (Plata et al., 2009). Cada uno de estos parámetros debe mantenerse dentro de cierto rango de operación con el objetivo de garantizar una conversión alta (Pérez et al., 2013).



## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

En este capítulo se presenta la metodología desarrollada para la evaluación de la productividad de *Scenedesmus acutiformis* en la producción de lípidos con potencial para producir biodiesel.

### 3. 1 Diseño experimental

Se llevó a cabo un diseño factorial multinivel considerando como factores la concentración de lixiviado, el fotoperiodo, la intensidad de luz y el tipo de fotobiorreactor. Para la concentración del lixiviado se consideraron tres niveles, al 15%, 30% y 50%, así mismo, se evaluaron tres sistemas de cultivo, uno abierto, un FBR de columna y un FBR de placa plana, para el fotoperiodo se consideró dos niveles, 12:12 y 16:8, para la intensidad de luz se utilizó dos niveles, 2500 y 3500 lux. Las variables de salida fueron, la cinética de crecimiento, el rendimiento de biomasa seca, la productividad de lípidos y la calidad de los ésteres metílicos de ácidos grasos. Se realizaron un total de 27 tratamientos, los cuales se evaluaron por triplicado, teniendo un total de 81 corridas.

Tabla 4. Diseño experimental para la evaluación de *Scenedesmus* sp en tres sistemas de cultivo.

<i>Tratamiento</i>	<i>FBR</i>	<i>Concentración de lixiviado %</i>	<i>pH</i>	<i>Nivel de iluminación (Lux)</i>	<i>Fotoperiodo</i>
T1a	Columna	15	7	2500	16:08
T1b	Columna	15	7	2500	12:12
T2a	Columna	25	7	2500	16:08
T2b	Columna	25	7	2500	12:12
T3a	Columna	50	7	2500	16:08
T3b	Columna	50	7	2500	12:12
T4a	Columna	15	7	3500	16:08



T4b	Columna	15	7	3500	12:12
T5a	Columna	25	7	3500	16:08
T5b	Columna	25	7	3500	12:12
T6a	Columna	50	7	3500	16:08
T6b	Columna	50	7	3500	12:12
<hr/>					
P1a	Plano	15	7	2500	16:08
P1b	Plano	15	7	2500	12:12
P2a	Plano	25	7	2500	16:08
P2b	Plano	25	7	2500	12:12
P3a	Plano	50	7	2500	16:08
P3b	Plano	50	7	2500	12:12
P4a	Plano	15	7	3500	16:08
P4b	Plano	15	7	3500	12:12
P5a	Plano	25	7	3500	16:08
P5b	Plano	25	7	3500	12:12
P6a	Plano	50	7	3500	16:08
P6b	Plano	50	7	3500	12:12
<hr/>					
A1	Abierto	15	7		
A2	Abierto	25	7	NA	Fotoperiodo solar 12:12
A3	Abierto	50	7		

Los tratamientos se evaluaron durante un periodo de 30 días, así también se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ) con el software Statgraphics.



### 3.2 Preparación del lixiviado de lombricomposta como medio de cultivo mixotrófico

#### 3. 2. 1 Caracterización fisicoquímica de los materiales de la composta

Previo al proceso de compostaje se realizó la caracterización fisicoquímica de los residuos a utilizar para el compostaje. Se utilizó estiércol de bovino, pasto verde, pasto seco y hoja seca de almendro. Se determinó carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO), cenizas, nitrógeno total (NT), relación Carbono/nitrógeno (C/N) y humedad, las determinaciones de estos parámetros se hicieron tomando como referencia la norma oficial mexicana NMX-FF-109-SCFI-2008, cada muestra se realizó por triplicado.

La determinación de humedad se realizó por el método gravimétrico el cual se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de material, las muestras fueron sometidas a secado en una estufa a  $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, hasta obtener un peso constante. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de la muestra húmeda y la masa de la muestra seca.

La determinación de cenizas se realizó utilizando una mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante dos horas, se colocó un gramo de cada muestra en crisoles de porcelana previamente secados y tarados, posteriormente a la calcinación las muestras fueron enfriadas y pesadas nuevamente. El porcentaje de cenizas se obtiene restando el peso del crisol calcinado al peso del crisol sin muestra, dividiendo este resultado entre los gramos de muestra y multiplicando por 100 para referirlo en porcentaje. La materia orgánica (MO) es igual al porcentaje de cenizas obtenido mediante calcinación. Para la determinación de carbono orgánico (CO) se dividió el porcentaje de materia orgánica (MO) entre 1.724 (factor de Van Benmelen).

La cuantificación de nitrógeno total (NT) se realizó por el método Kjeldahl, se inició con el proceso de digestión, donde se utilizó un gramo de cada muestra, el proceso duró aproximadamente 2 horas hasta que el material en digestión tomó color verdoso claro y se dejó enfriar. Posteriormente se realizó la destilación, se le agregaron de 300 a 350 mL de agua destilada, de 6 a 7 lentejas de zinc, algunas virutas de parafina o gotas de aceite mineral como antiespumante, perlas de vidrio y 100 mL de hidróxido de sodio saturado al 40 %. El destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 50 mL de ácido bórico



al 4 % más 50 mL de agua destilada y de 4 a 5 gotas de indicador universal, la destilación finalizó cuando el destilado alcanzó los 350 mL y posteriormente se procede a titulación con ácido clorhídrico 0.1 N y se anota los mililitros gastados. Para el cálculo se multiplica el gasto de ácido clorhídrico consumido en mL por la normalidad del ácido clorhídrico por 0.014 que es el miliequivalente del nitrógeno; posteriormente se divide entre el peso de la muestra en gramos y se multiplica por 100 para referirlo a por ciento.

Finalmente, la relación carbono – nitrógeno (C/N) se obtuvo a partir de la división del porcentaje de carbono orgánico (%CO) entre el porcentaje de nitrógeno total (%NT).

### 3.2.2 Establecimiento de la composta:

Para el establecimiento de la composta se utilizó una mezcla de residuos que contenía 35% de estiércol de bovino, 5% de pastos verdes, 50% de pastos secos y hojas de almendro y 10% de residuos de papaya, se compostó un total de 60 kg de residuos (figura 6). El composteo se realizó durante 60 días, además de 30 días de maduración. Durante este periodo se monitoreo la humedad, temperatura y pH diariamente. Una vez alcanzada la maduración se procedió con el lombricomposteo, añadiendo a la composta lombrices rojas californianas (*Eisenia foétida*) que permitió la obtención de un lixiviado de acuerdo con la NMX-FF-109-SCFI-2007, posteriormente se inició con la recolección del lixiviado.

La recolección del lixiviado se realizó 30 días posteriores a la inoculación de las lombrices, a través de goteo por gravedad, su almacenaje se realizó a temperatura ambiente en botellas de plástico con capacidad de 3 litros.



Figura 6. Etapas de la degradación de la composta y producción de lixiviado durante un periodo de 90 días.

### 3.3 Establecimiento del sistema de cultivo

#### 3.3.1 Fotobiorreactor de columna

Para el fotobiorreactor de columna se utilizaron botellas de tereftalato de polietileno con capacidad para tres litros, cada botella tiene un diámetro de 10 cm y una altura de 35 cm, en la parte superior se colocó una manguera que suministró la aireación y mezclado al sistema, para ello se utilizó una bomba de aire para pecera de la marca AKKEE de 200-240 V con una aireación de 1.

4 vvm. Se ensambló el sistema colocando un total de 12 botellas con capacidad para 36 L de cultivo (figura 7). La iluminación del sistema se realizó colocando lámparas de luces LED de 16 vatios, que se colocaron alrededor del FBR a una distancia de 10 cm, proporcionando 2500 y 3500 lux ( $46,25$  y  $64,75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente), la medición de la intensidad luminosa se realizó con un luxómetro de la marca Steren.

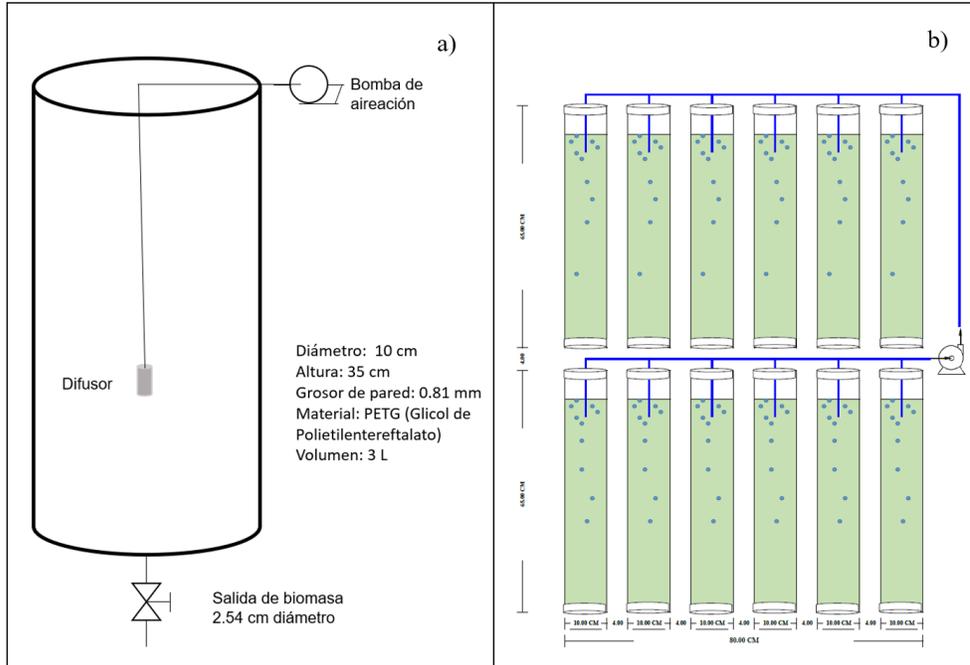


Figura 7. Diseño del sistema de cultivo cerrado, a) fotobiorreactor de columna con capacidad para 3 L, b) Sistema de cultivo de columna acoplado con capacidad para 36 L.

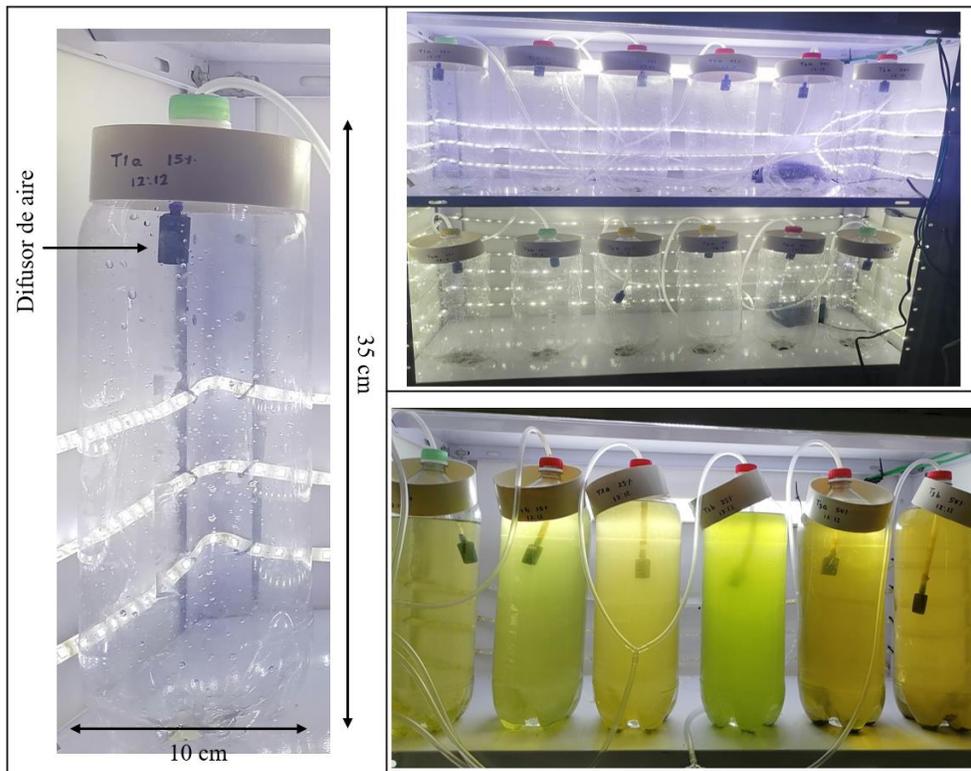


Figura 8. FBR de columna con capacidad para 3 L evaluado bajo condición mixotrófica.

### 3.3.2 Fotobiorreactor tipo plano o de placa plana

Para la construcción del fotobiorreactor tipo plano se utilizó material de cristal, se colocaron dos láminas de cristal transparente de 5 cm de ancho por 25 x 25 cm de largo y alto, la capacidad de cada placa fue de 3 L, se acopló un sistema con un total de 12 placas planas (figura 8). Para el suministro de aire se utilizó una bomba en la parte superior, este mecanismo también permitió el mezclado dentro del medio de cultivo, para ello se utilizó una bomba de aire para pecera de la marca AKKEE de 200-240 V con una aireación de 1,4 vvm. La iluminación del sistema se realizó colocando lámparas de luces LED de 16 vatios, que se colocaron alrededor del FBR a una distancia de 10 cm, proporcionando 2500 y 3500 lux ( $46,25$  y  $64,75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente), la medición de la intensidad luminosa se realizó con un luxómetro de la marca Steren.

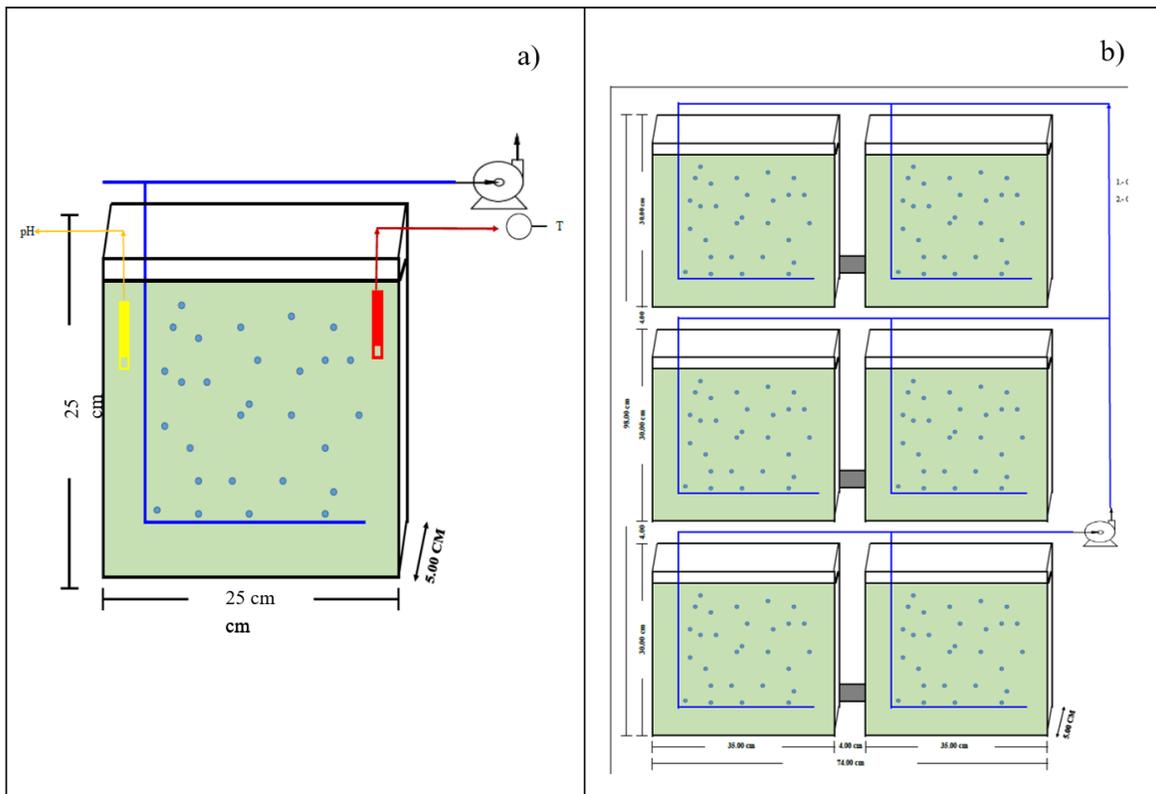


Figura 9. Diseño del sistema de cultivo cerrado, a) fotobiorreactor de placa plana con capacidad para 3 L, b) Sistema de cultivo de placa plana acoplado con capacidad para 36 L.

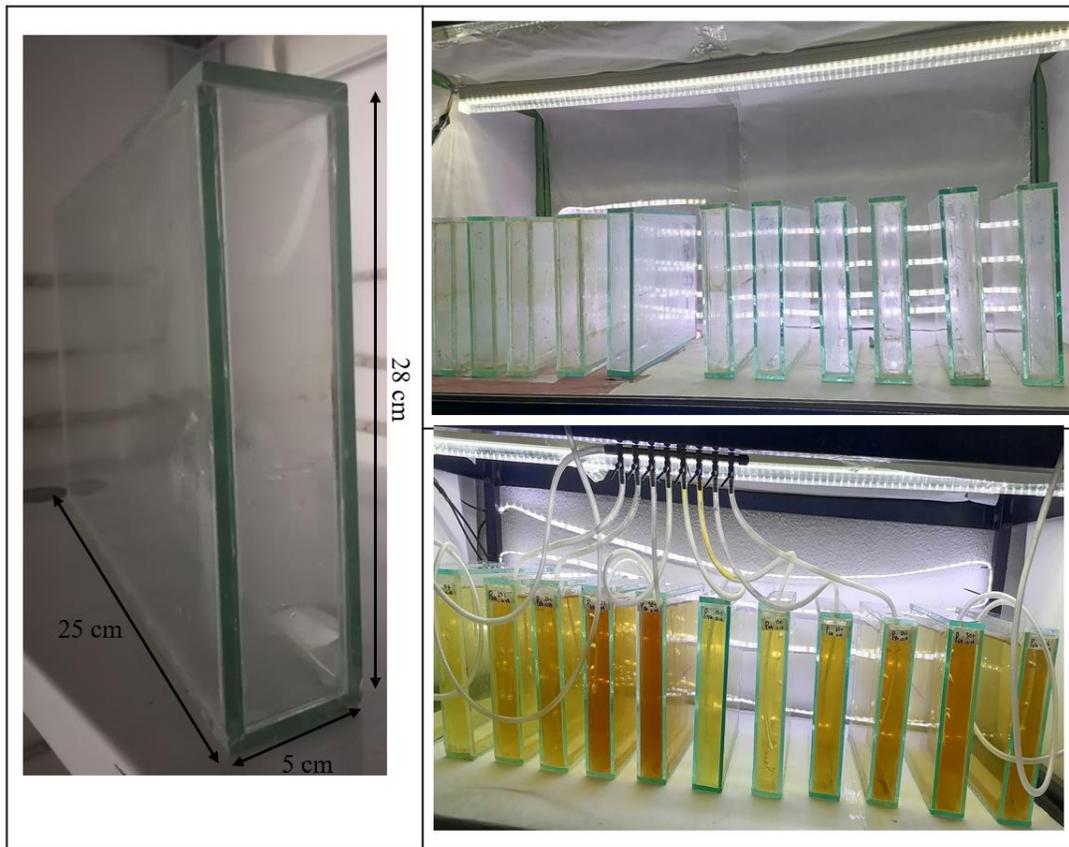


Figura 10. FBR de placa plana con capacidad para 3 L evaluado bajo condición mixotrófica.

### 3.3.3 Sistema de cultivo abierto (raceway)

Finalmente, el biorreactor tipo raceway fue acondicionado con piscinas de plástico de 20 cm de profundidad (Chen et al. 2011; Wang et al. 2012; Ación et al. 2017), se instaló un inyector de aireación mediante bomba, para ello se utilizó una bomba de aire para pecera de la marca AKKEE de 200-240 V con una aireación de 1.4 vvm. El sistema fue evaluado a condiciones ambientales de luz y oscuridad en un fotoperiodo de 12:12 respectivamente.

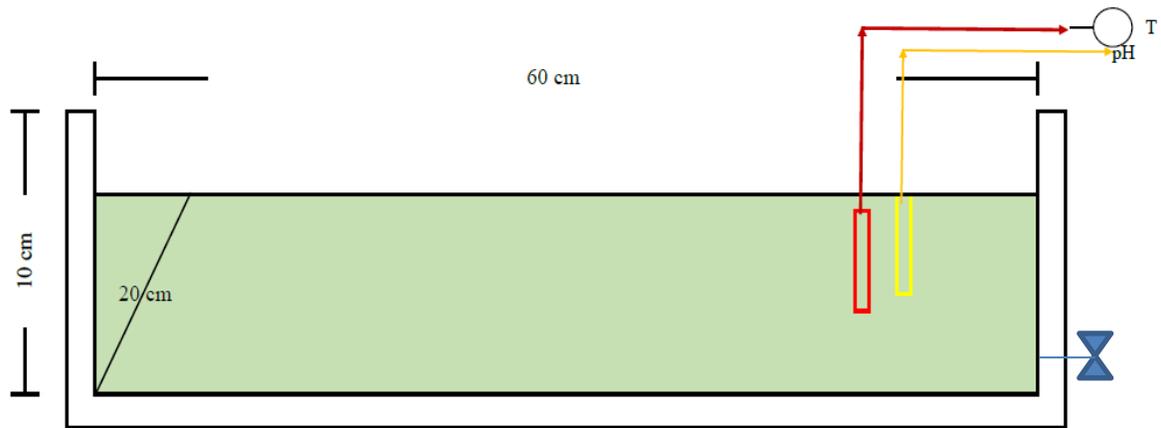


Figura 11. Diseño del sistema de cultivo abierto (raceway) con capacidad para 5 L.



Figura 12. Sistema de cultivo abierto (raceway) con capacidad para 5 L evaluado en condición mixotrófica.



### 3.4 Preparación del medio de cultivo

Primeramente, se realizó la filtración del lixiviado de lombricomposta con ayuda de una bomba de vacío utilizando papel filtro Whatman número 1 de 0,45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente para los tratamientos evaluados en los dos FBRs (columna y de placa plana) se prepararán tres concentraciones de lixiviado de lombricomposta 15%, 25% y 50%, el porcentaje restante se completó con agua, se prepararon 3 L para cada fotobiorreactor. En el caso del sistema abierto se preparó un total de 5 L para cada tratamiento.

La cepa de microalga fue proporcionada por el cepario de la Universidad Politécnica de Chiapas ubicado en el municipio de Suchiapa, Chiapas. Una parte de la muestra se observó con un microscopio para su identificación, luego se analizó para determinar la frecuencia de tamaño de las células de algas por ml de suspensión usando una FlowCam (Fluid Imaging Technologies), los tamaños se expresaron como longitud equivalente (EL) (Sieracki et al., 1998). La identificación y validación de la especie se realizó microscópicamente según Sheath y Wehr, (1973), encontrándose que la morfología corresponde a *Scenedesmus acutiformis*, el nombre científico latino y la clase fueron confirmados en la base de datos de AlgaeBase ID: 27859 (<http://www.algaebase.org/>); ID de Dyntaxa: 257449 (<http://www.artdata.slu.se/dyntaxa/>); código REBECCA: R0755 (<http://www.freshwaterecology.info/>) y base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

### 3.5 Análisis de densidad celular

El cultivo se inició con una densidad celular de  $1.3 \times 10^3$  cel/ml de *Scenedesmus acutiformis*, el periodo de evaluación fue de 30 días (Ortiz et al., 2012; Daneshvar, et al 2020).

La concentración de la biomasa microalgal se determinó en todos los tratamientos por recuento diario de células utilizando una hemacitómetro Neubauer. Los datos generados se utilizaron para construir las curvas de crecimiento, se determinó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) en la fase exponencial según Wood et al, (2005) y Guillard (1973); de acuerdo a las siguientes fórmulas:



La tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) se calculó a partir de la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde,  $N_2$  es la concentración del número de células a los 30 días y  $N_1$  es el número de células a los 28 días,  $t_2$  se consideró el tiempo final, es decir 30 días y  $t_1$  28 días).

El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

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

Posterior a 30 días de evaluación se realizó la recuperación de biomasa producida, mediante filtración simple utilizando papel filtro de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior extracción de aceite.

### **3.6 Extracción de lípidos**

Para la obtención de lípidos se utilizó la técnica de extracción mediante Soxhlet, para lo cual se pesó 2 g de microalga seca, la cual se colocó en un dedal de celulosa, para el proceso de extracción se utilizó hexano al 98% como disolvente, la extracción se realizó durante dos horas a temperatura de 68°C (AOAC, 1990, Peralta et al., 2012, Soto et al., 2014, Oliveira et al., 2017). Posteriormente se llevó a destilación utilizando un rotoevaporador para la recuperación de aceite, previamente se realizó un lavado al matraz Soxhlet utilizando éter etílico anhidrido. Finalmente, se pesó en el matraz de fondo redondo y por diferencia de peso se obtuvo el porcentaje de aceite extraído (Sánchez et al., 2020).

### **3.7 Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

El análisis del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo mediante espectroscopía de masas por cromatografía de gases (GC-MS). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon usando el siguiente procedimiento: se mezclaron 30 mg de lípido total disuelto en 1 ml de metanol con 1 ml de una solución de KOH al 12% preparada en metanol, a esta



solución se le añadió un volumen igual de HCl al 5% en metanol y se calentó a 75°C durante 15 min. Esta solución se dejó enfriar y se añadió 1 ml de agua destilada y se agitó. La capa orgánica superior que contenía ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se transfirió cuidadosamente a un vial nuevo y limpio. El análisis GC-MS de FAME se realizó utilizando una columna capilar de succinato de dietilenglicol (30m x 0,25 x 0,25  $\mu$ m). Se inyectaron 100  $\mu$ l de solución de muestra de éster metílico para cada análisis. Se utilizó helio como gas portador. La temperatura del inyector fue de 180°C y la temperatura del detector fue de 230°C, la cual se incrementó a 300°C con un gradiente de temperatura de 15°C/min (Härtig, 2008; Soto et al., 2014).

### **3.8 Análisis estadístico**

Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos evaluados se realizó la prueba ANOVA unidireccional al nivel de significancia  $p < 0.05$ ; el software estadístico utilizado fue el STATGRAPHICS PLUS (1999) para Windows, utilizando los datos de tres repeticiones en cada tratamiento. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey para comparar medias de tratamientos.

Así mismo se realizó un análisis de superficie respuesta para determinar la optimización de las variables de producción de lípidos de la biomasa microalgal en los tres sistemas de fotobiorreactores, mediante el uso del software Minitab Statistical Software 22, los criterios a tomar en cuenta fueron el rendimiento de lípidos y el perfil de ácidos grasos.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de los materiales de la composta

En la tabla 5 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica realizada en los materiales de la composta, en donde se midió el porcentaje de humedad, de cenizas, la materia orgánica y el carbono orgánico, el porcentaje de nitrógeno total y la relación carbono/nitrógeno. En los resultados mostrados se observa que existe mayor humedad en residuos frescos como papaya (PA) y pasto verde (PV) respecto a los residuos secos, mientras que la materia orgánica es mayor en estiércol bovino (EB), seguido de hojas de almendro (HA) y pasto verde (PV). En cuanto al carbono orgánico (CO) y nitrógeno total (NT), se observa que el pasto verde es el que presenta mayores valores con una relación C/N de 10.81.

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los residuos utilizados para la composta

Muestra	%H	%Cenizas	%MO	%CO	%NT	C/N
PA	92.43±1.7*	0.62±0.17	0.62±0.17	0.36±0.17	0.23±0.21	1.55
PV	71.90±0.3	12.43±0.08	12.43±0.08	7.21±0.08	0.55±2.76	13.04
PS	12.08±1.5	6.88±1.08	6.88±1.08	3.99±1.08	0.93±0.49	4.29
HA	10.20±0.06	14.68±0.75	14.68±0.75	8.51±0.75	0.67±0.35	12.80
EB	22.07±1.4	21.01±1.4	21.01±1.4	12.19±1.4	1.13±0.64	10.81

CO: Carbono orgánico, MO: Materia orgánica, C/N: Relación carbono-nitrógeno; NT: Nitrógeno total, PA: papaya, PV: pasto verde, PS: pasto seco, HA: hojas de almendro, EB: estiércol de bovino.

\* Promedio de tres repeticiones ( $\pm$ error estándar).

Todos los residuos se colocaron en capas para formar un abono y comenzar una degradación de 30 días (Albalate-Ramírez et al., 2023).

En figura 13 se observa la cinética de degradación de la composta en un periodo de 50 días, en donde se puede observar que hasta el día 15 se mantiene la etapa mesófila donde la temperatura alcanzada es de 27°C con un pH de 6, esta etapa se caracteriza por alcanzar temperaturas de 10-42°C (Moreno et al, 2008), la etapa termofílica se observó del día 16 al 28, alcanzado una temperatura máxima de 38°C, en esta etapa y dependiendo de los materiales de la composta se puede alcanzar hasta los 59°C (Pérez et al, 2010; Moreno et al, 2008). El enfriamiento de la composta se inició en el día 50 y posteriormente la maduración por un periodo de 30 días.

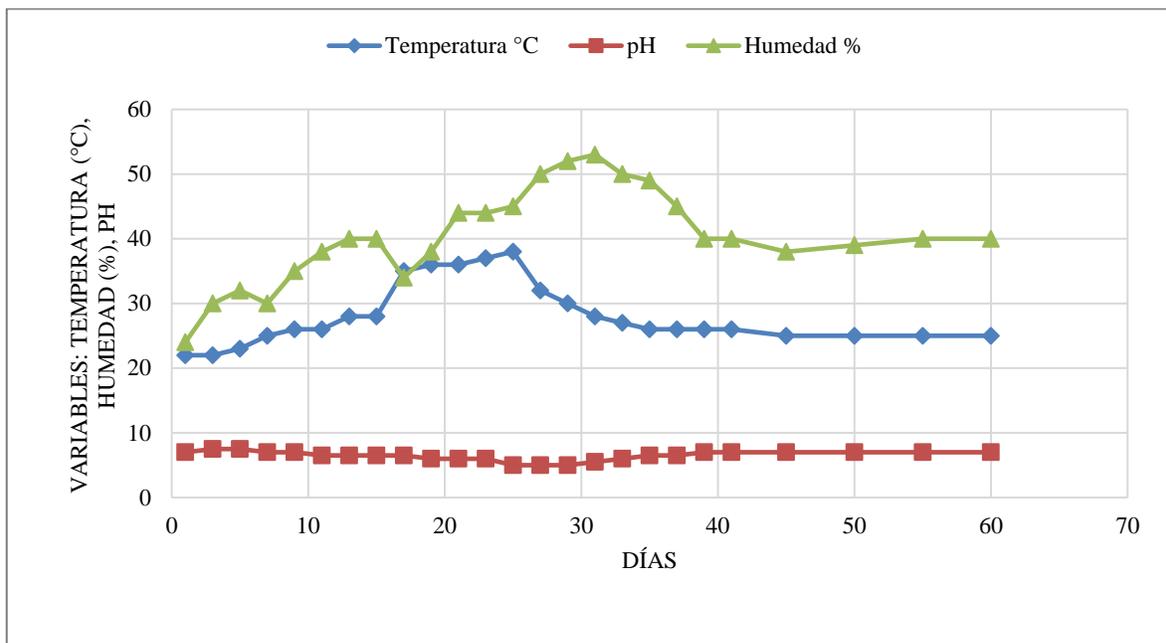


Figura 13. Cinética de degradación de la composta, respecto a la temperatura, humedad y pH, periodo de evaluación 60 días.

Al término del proceso de degradación de la composta el humus de lombriz presentó un pH de 7.5 el cual se considera como neutro, esto concuerda con lo reportado por Pérez et al., 2010, donde el pH final se mantuvo de 7.37-7.36; de acuerdo con la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 el humus puede tener de 5.5 a 8.5 en la escala de acidez. La humedad final fue de 39°C, esta depende de la frecuencia y cantidad de riego, de acuerdo con la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 la humedad debe oscilar de 20 a 40% sobre materia húmeda, aunque se han reportado valores de humedad del 40 al 60% (Haug et al. 2014; López, 2010;



Barrera et al, 2006). Otros criterios de calidad son el color y el olor, en el caso de la coloración se observó de negro a café oscuro, mientras que el olor fue característico a tierra húmeda, ausente de olores pestilentes. Finalmente, la porosidad del humus se determinó mediante tamizado encontrándose un tamaño de partícula  $\geq 5$  mm.

#### 4.2 Caracterización fisicoquímica del lixiviado de lombricomposta

En la tabla 6 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica del lixiviado de lombricomposta, en donde se determinó fósforo, nitrógeno y potasio total, pH y turbidez, los resultados observados corresponden a un pH de 7.85, encontrándose ligeramente por arriba del pH neutro, la turbidez fue de 3618 NTU. Los nutrientes más abundantes son el fósforo con una concentración de  $8.02 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido del potasio total con una concentración de  $1.9 \text{ mg L}^{-1}$ .

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica del lixiviado de lombricomposta

Parámetro	Concentración
Fósforo	$8.02 \text{ mg L}^{-1}$
pH	7.85
Nitrógeno total	$0.5 \text{ mg L}^{-1}$
Potasio total	$1.9 \text{ mg L}^{-1}$
Turbidez	3618 NTU

NTU: Unidad de turbidez nefelométricas, pH: Potencial de hidrógeno.

El contenido de nitrógeno se considera limitado siendo de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , esta limitación de nitrógeno beneficia la acumulación de lípidos en la biomasa microalgal, tal como se demostró por Yang et al. (2014) al observar que las diferentes concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tuvieron un efecto significativo en la acumulación total de lípidos, sin embargo, el aumento de las concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  mejoraron la producción de lípidos inicialmente, pero luego, con el aumento sus concentraciones



superiores a 3,07 y 15,49 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, la producción de lípidos disminuyó. Otro factor importante es la relación N:P, para garantizar la estabilidad del proceso, pues las grandes cantidades de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pueden inhibir el crecimiento, al igual que las concentraciones por encima de los 80 mg N-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> y la limitación de fósforo (Pereira et al., 2016; Chang et al., 2023; Sniffen et al., 2016).

Asimismo, un parámetro importante es el pH, esta variable promueve el establecimiento de una condición óptima para la propagación de biomasa de microalgas, por lo tanto, en trabajos anteriores se ha determinado que los valores óptimos de pH están entre 6 y 8, lo que demuestra la mejor actividad metabólica por *Scenedesmus sp.* (Mandotra et al., 2016; Waqar et al., 2023), estos valores coinciden con los obtenidos en el lixiviado de lombricomposta generados en este trabajo de investigación.

En este sentido, conocer los residuos que integran la composta y su composición fisicoquímica permiten la estandarización de la mezcla y conocer las propiedades fisicoquímicas características del lixiviado que garantizarán la aceptación metabólica por la biomasa de las microalgas.

### **4.3 Productividad de la biomasa microalgal de *Scenedesmus acutiformis***

En la figura 14 se muestra la productividad de biomasa de *Scenedesmus acutiformis*, la cual se determinó primeramente por la densidad celular acumulada durante 30 días de evaluación, la cual se cuantificó por recuento de células, obteniendo que en el FBR de columna (T) la máxima densidad celular se presentó en el tratamiento T6b con un fotoperiodo de 12:12 y una iluminación de 3500 lux (64,75 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), alcanzando una densidad máxima de 3.30X10<sup>6</sup> células/mL en el día 30, con un tiempo de generación de 4.07 días y una tasa de crecimiento específico 0.17 generaciones/día. Los menores rendimientos se observan en los tratamientos T1a y T1b, a una iluminación de 2500 lux (46,25 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y fotoperiodo 16:08, 12:12 respectivamente, estos se caracterizan por

contener menor concentración de lixiviado (15%). En la figura 14 se puede observar que al día 30 se alcanza la fase exponencial de crecimiento de todos los tratamientos evaluados.

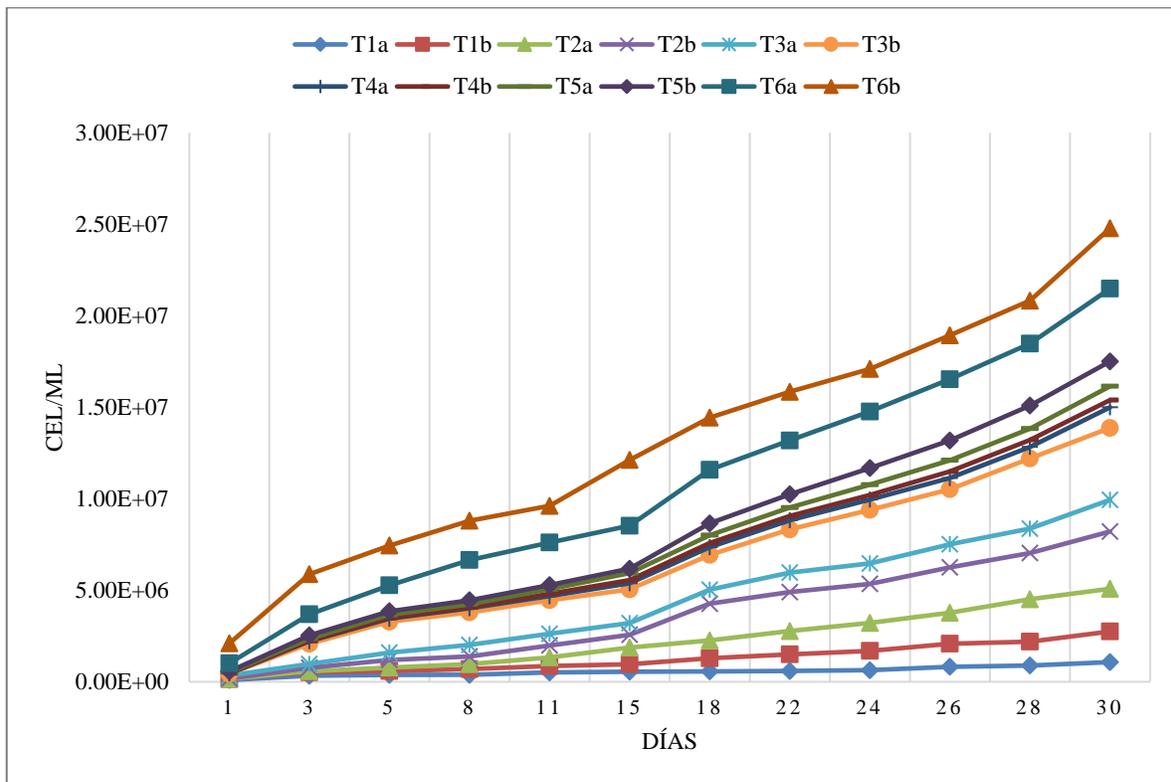


Figura 14. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica en un FBR de columna, en un periodo de evaluación de 30 días. Se muestran los valores promedios de tres repeticiones ( $\pm$ error estándar).

En la figura 15 se muestra la cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* en el FBR de placa plana (P), en donde se observa que la máxima densidad celular se alcanzó también en el día 30, siendo el tratamiento P6b, con un fotoperiodo 12:12 y una iluminación de 3500 lux ( $64,75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) el que alcanzó una densidad máxima de  $8.54 \times 10^6$  células/mL, con un tiempo de generación de 3.77 días y una tasa de crecimiento específico de 0.18 generaciones/día. Los menores rendimientos se observan en los tratamientos P1a y P1b, a una iluminación de 2500 lux ( $46,25 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo 16:08 y 12:12 respectivamente, estos se caracterizan por contener menor concentración de lixiviado.

Se puede observar que durante la etapa de latencia la adaptación fisiológica tanto en el FBR de columna (T) como en el FBR de placa plana (P) tarda en promedio 24 días, alcanzándose la fase exponencial al día 30, la duración de cada una puede variar de acuerdo con las condiciones del cultivo y el tipo de especie, sin embargo, esto permitió mayor acumulación de biomasa, ya que se ha demostrado que la etapa de latencia y fase exponencial son las de mayor productividad de biomasa, debido a que la fase estacionaria tarda de 1 a 5 días, posterior a ello se inicia la disminución de su densidad.

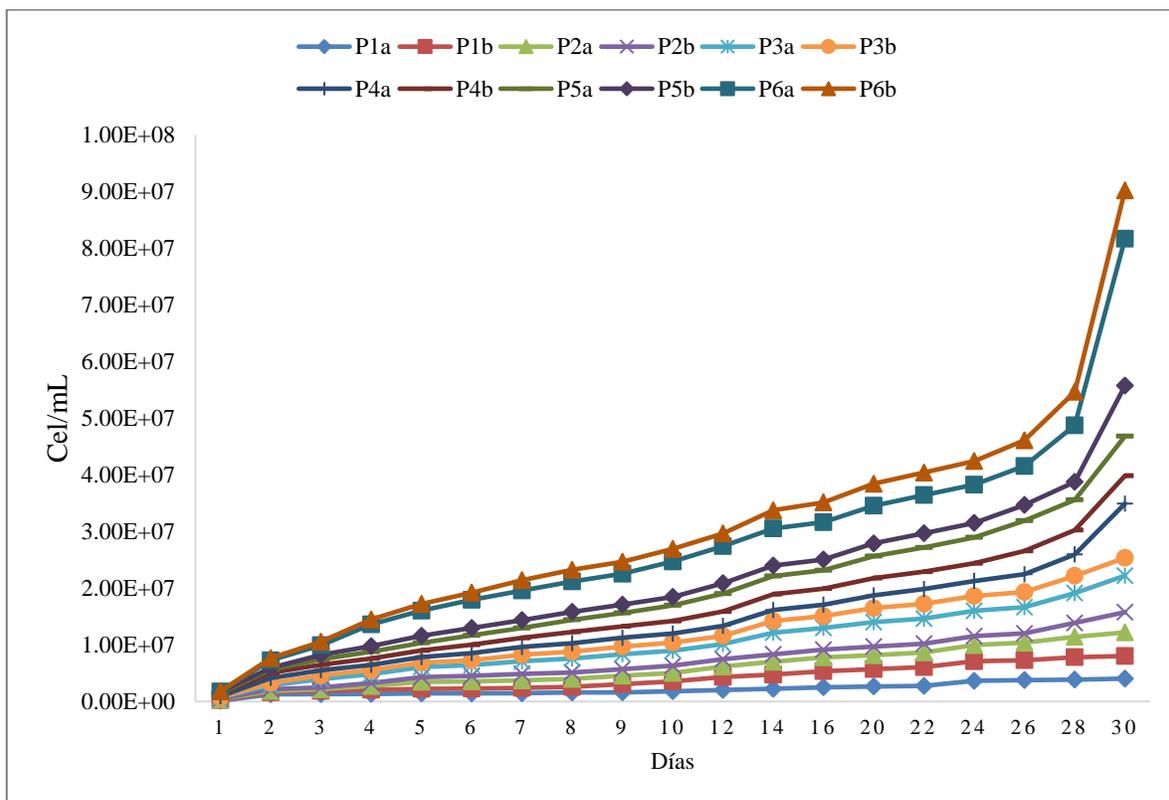


Figura 15. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica en un FBR de placa plana, en un periodo de evaluación de 30 días. Se muestran los valores promedios de tres repeticiones ( $\pm$ error estándar).

Respecto al fotoperiodo y a los niveles de iluminación utilizados en el cultivo, el análisis estadístico demostró que no existe diferencia estadística significativa entre los dos fotoperiodos evaluados (16:08 y 12:12) ni para los dos niveles de iluminación utilizados

(2500 y 3500 lux), esto representa una oportunidad para ajustar los costos de operación en las condiciones de cultivo de la microalga *Scenedesmus acutiformis*.

Durante la evaluación de la cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis*, se observó que la aireación constante es un factor de crecimiento importante, ya que afecta significativamente la tasa de crecimiento celular del género *Scenedesmus*, y por ende en su rendimiento de biomasa, considerando que las mejores condiciones fueron con una aireación de 1,4 vvm, que no permitió que las células permanecieran estáticas, agotando rápidamente el sustrato (Huang et al., 2014; Robles-Heredia et al., 2016; Daneshvar et al., 2021).

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* en el sistema de cultivo abierto (A), en donde se observa que la máxima densidad celular fue en el tratamiento A2 alcanzando una densidad máxima en el día 30 de  $1.09 \times 10^7$  Cel/mL a una concentración de lixiviado de 25%, seguido por el tratamiento A3, el cual alcanzó su máxima densidad celular en el día 18 con una concentración de  $1.08 \times 10^7$  Cel/mL.

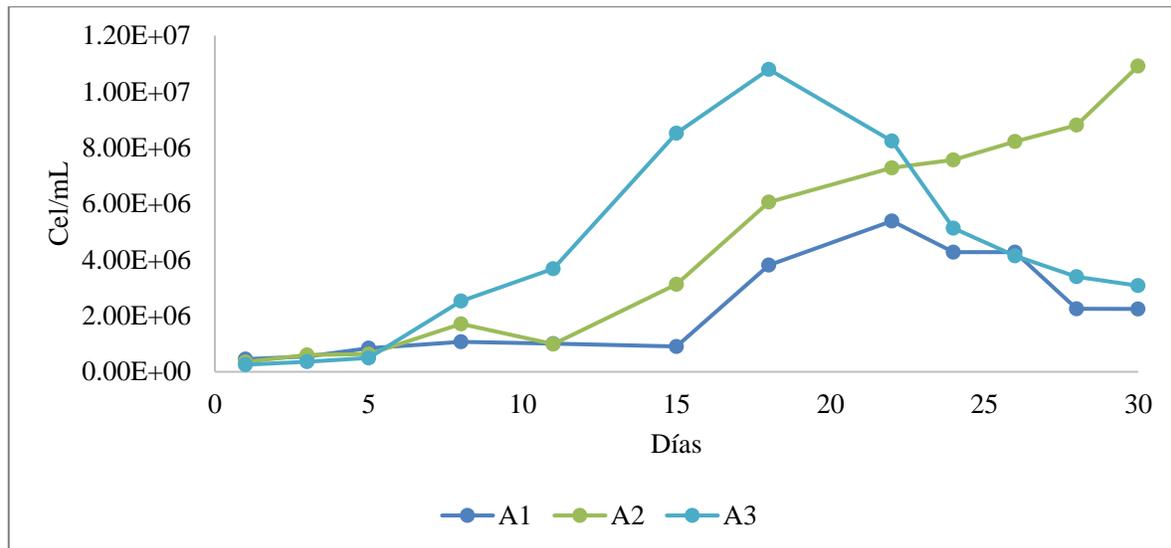


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica en un sistema abierto en un periodo de evaluación de 30 días, los valores muestran el promedio de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar).

Este sistema fue evaluado sin controlar las condiciones de cultivo, expuesto a la luz solar, por lo que el comportamiento de crecimiento que se observa en la figura 16 difiere de lo observado en los sistemas cerrados (figura 14 y 15), observándose que los tratamientos A1 y A3 presentan etapa corta de latencia y la disminución de la densidad celular a partir del día 22, mientras que el tratamiento A2 con 25% de lixiviado continua en fase exponencial al día 30, nuevamente se observa que los tratamientos con mayor concentración de lixiviado presentan una mayor densidad celular. A pesar de que la máxima densidad celular se observa en el tratamiento A2, el mayor rendimiento acumulado de biomasa se presenta en el tratamiento A3 con concentración de 50% de lixiviado.

En la figura 17 se observa la productividad de biomasa a los 20 días de evaluación, en la figura a se observa el FBR de columna, en la figura b, el FBR de placa plana y en la figura c, el sistema abierto.

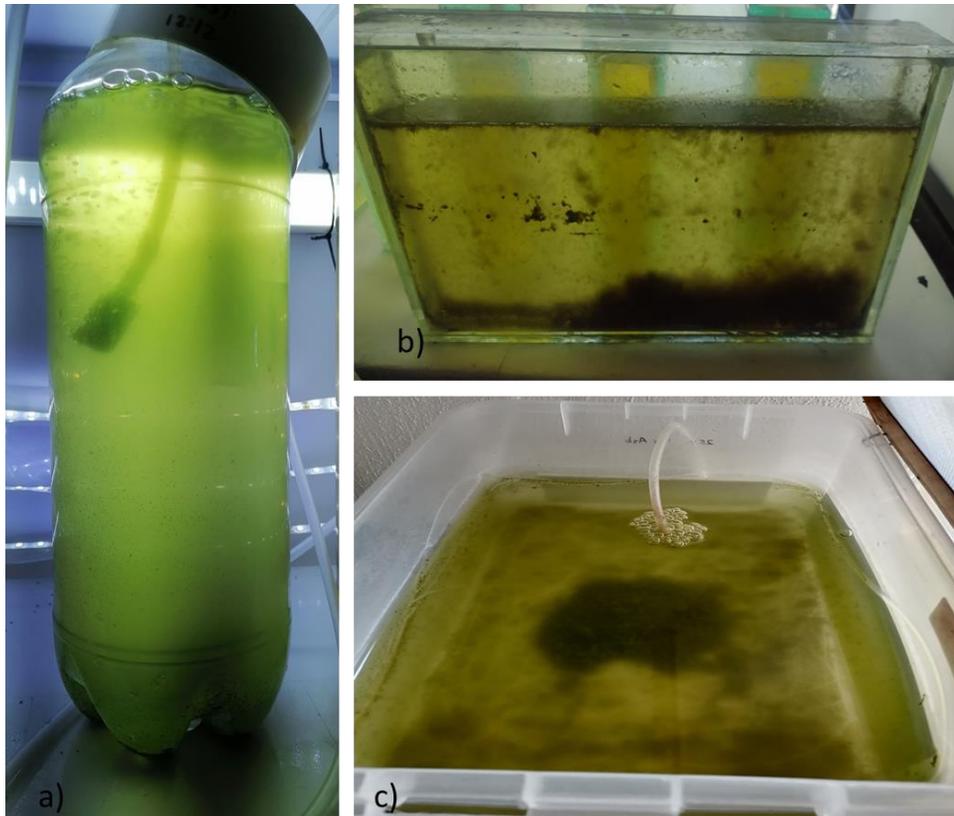


Figura 17. Densidad celular alcanzada a los 30 días de *Scenedesmus acutiformis* utilizando como medio de cultivo lixiviado de lombricomposta en a) FBR de columna, b) FBR de placa plana y c) Sistema de cultivo abierto.

En la figura 18 se observa la productividad de biomasa seca de *Scenedesmus acutiformis* en  $\text{mg L}^{-1}$  de los tres sistemas evaluados en un total de 27 tratamientos (tabla 4), en donde se muestra una productividad de biomasa seca que oscila de 31 a  $776 \text{ mg L}^{-1}$ , de los tres sistemas evaluados el sistema abierto presentó una mayor productividad de biomasa siendo el tratamiento A3 con 50% de lixiviado el que alcanzó una productividad de  $776.2 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido del sistema FBR de placa plana en donde se alcanzó una productividad máxima de  $727.1 \text{ mg L}^{-1}$  en el tratamiento P6b con 50% de lixiviado con un fotoperiodo 12:12 y un nivel de iluminación de 3500 lux, la menor productividad se observó en el sistema FBR de columna, alcanzando una máxima productividad de  $550.9 \text{ mg L}^{-1}$  en el tratamiento T3a con 50% de lixiviado un fotoperiodo 16:08 y un nivel de iluminación de 2500 lux. La mayor productividad de biomasa se alcanzó en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado (50%) T3a, T6b, P3b, P6b y A3 con una productividad de 550.9, 432.6, 428.5, 727.1 y  $776.2 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, siendo los tratamientos con concentración de 15% de lixiviado los que presentaron menor productividad.

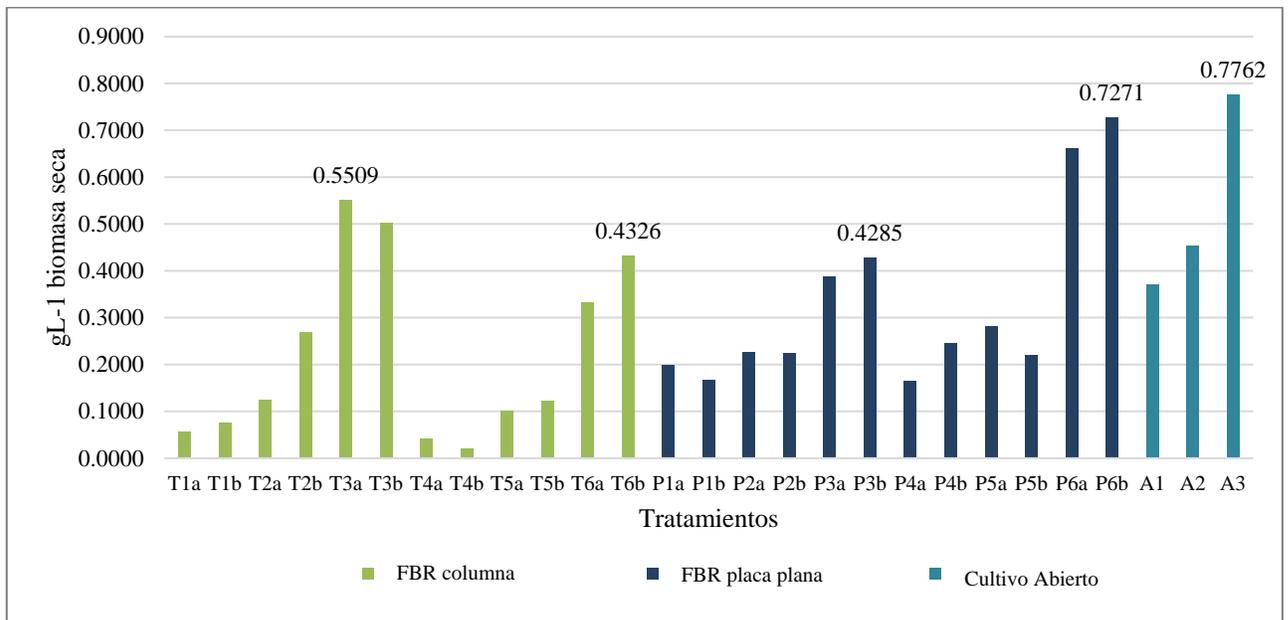


Figura 18. Rendimiento de la biomasa seca de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica en tres sistemas de cultivo, en un periodo de evaluación de 30 días, los valores muestran el promedio de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar).



Es importante destacar que el lixiviado no recibió ningún tratamiento previo a su uso como medio de cultivo, esto representa una ventaja ya que se disminuyen las operaciones unitarias involucradas en el cultivo de microalgas. Los estudios utilizando lixiviados como medio de cultivo siguen estando a escala laboratorio, Nordin y Samsudin (2017) utilizaron lixiviados de vertedero nitrificados como medio de cultivo a concentraciones de 10 – 30%, evaluaron la productividad de 3 cepas de algas (*Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Oscillatoria sp.*), encontrando que *Scenedesmus sp.* alcanzó una productividad máxima de 639.77 mg/L/día en concentración de 10% de lixiviado, mientras que en concentraciones más altas se observó toxicidad. Estos resultados coinciden con diversos estudios realizados con consorcios de microalgas (*Desmodesmus spp.* y *Scenedesmus obliquus*) y bacterias, en donde se comparó la tolerancia de microalgas a diferentes concentraciones de lixiviado ( $\leq 10\%$ , 15%, 20%, 30% y 50%), demostrando que en concentraciones de hasta el 10% hubo crecimiento de microalgas y reducción de nitrógeno amoniacal y ortofosfatos, mientras que en concentraciones mayores se presentó una inhibición en el crecimiento, atribuido al alto nivel de amoníaco (Hernández et al., 2019; Zhao et al., 2014; Cheah et al., 2016; Lin et al., 2007).

Por otro lado, en este trabajo se observa una alta productividad de biomasa, observándose diferencias estadísticas significativas entre la concentración de lixiviado utilizado en los tratamientos evaluados (tabla 7), estos resultados están relacionados con la composición química del lixiviado y la capacidad de las microalgas para asimilar dióxido de carbono y nutrientes, así mismo, se destaca la importancia de producir lixiviados y caracterizarlos para garantizar una concentración de compuestos tolerada por las microalgas y que a su vez se favorezca la síntesis de metabolitos de interés (Ortiz et al., 2023; Hu et al., 2021).

#### **4.4 Productividad de lípidos de *Scenedesmus acutiformis***

En la figura 19 se observa la productividad de lípidos de los tres sistemas evaluados, en los que se cuantificó la productividad de aceite extraído mediante el método Soxhlet, en la imagen se observa que el rendimiento oscila entre 12.6 – 51.9%, siendo el sistema abierto

(A) el que presentó mayor rendimiento de aceite en comparación con los FBRs de columna (T) y de placa plana (P), la mayor productividad fue de 51.9% en el tratamiento A3 sistema abierto con 50% de lixiviado, seguido del tratamiento A2 con 47.3% en sistema abierto con 25% de lixiviado. De los dos sistemas de FBRs evaluados, el FBR de placa plana mostró mayor rendimiento, la mayoría de los tratamientos superaron el 30% de acumulación de lípidos, mientras que en el FBR de columna los rendimientos máximos fueron de 25.5 y 28.7% en los tratamientos con 50% de lixiviado. Nuevamente se observa menor rendimiento de lípidos en los tratamientos con menor concentración de lixiviado (15%), mostrando una diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones de lixiviado evaluadas y los tres sistemas de cultivo.

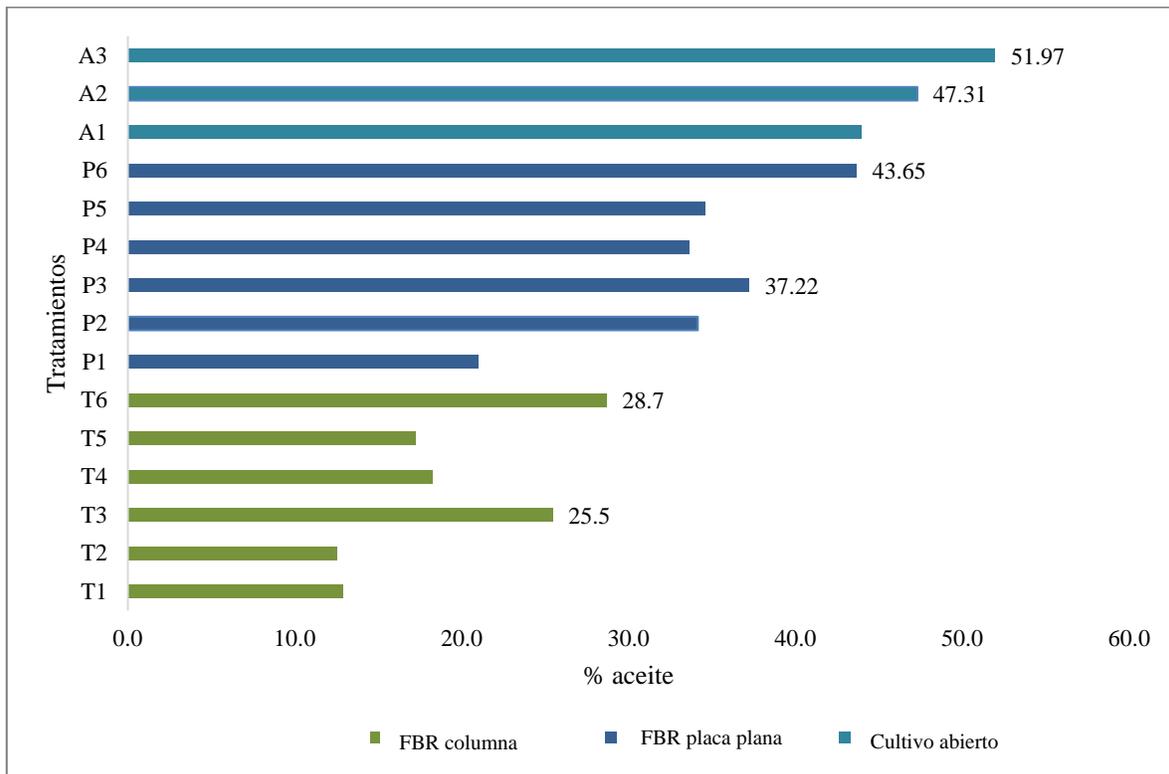


Figura 19. Rendimiento de lípidos de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica en tres sistemas de cultivo, en un periodo de evaluación de 30 días, los valores muestran el promedio de tres repeticiones ( $\pm$  error estándar).



Los valores encontrados en los FBRs concuerdan lo reportado por Korozi et al., (2023) quien bajo condición mixotrófica y bajo iluminación de luz LED logró una productividad de 26.6% de acumulación de lípidos de *Scenedesmus quadricauda*, mientras que para el sistema abierto estos valores están por arriba de lo reportado. El contenido de nutrientes en el lixiviado como medio de cultivo fue determinante para la productividad y acumulación de lípidos, cabe mencionar que la concentración de nitrógeno (N) y potasio (K) en el lixiviado es de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y 1.19 mg L<sup>-1</sup> respectivamente (tabla 7), por lo que se puede considerar que existe una limitación de estos nutrientes, se ha demostrado que las algas del filo *Chlorophyta* tienen un contenido de lípidos entre el 20 % y 30 % del peso seco en un medio rico en nutrientes, sin embargo, la limitación de N induce la acumulación de lípidos hasta un 64% del peso seco (Griffiths et al., 2009; Li et al., 2011). Un estudio realizado por Kumari et al., (2021) reportó una reducción del 10% en la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* y un aumento del 32% en los lípidos con un 85% de grasas saturadas bajo limitación de N y P, otro estudio realizado por Vázquez en 2011 logró aumentar significativamente la productividad de lípidos de *Scenedesmus sp.* a 133.55 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> bajo limitación de N. Así mismo, se ha demostrado que la mayor acumulación de lípidos es en la fase estacionaria, al detenerse la división celular se aumenta la concentración de triacilglicéridos (Converti et al., 2009; Hu et al., 2008); sin embargo, como se observa en la cinética de crecimiento en la mayoría de los tratamientos evaluados en esta investigación fueron cultivados a los 30 días, cuando el crecimiento aún se encuentra en fase exponencial, por lo que la prolongación del cultivo posterior a los 30 días aumentaría la concentración de lípidos.

Sin embargo, pese a que el crecimiento se detuvo en la fase exponencial, los rendimientos de lípidos se encuentran por arriba de lo reportado en la literatura, tomando en cuenta que se utilizaron concentraciones de hasta 50% de lixiviado. Hernández et al. (2019) reportó un rendimiento máximo de 20% de lípidos de un consorcio de microalgas (*Desmodesmus spp.* y *Scenedesmus obliquus*) utilizando concentraciones de lixiviado menores a 10%, Chang et al. (2018) logró una producción de 10 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de lípidos de *Chlorella vulgaris* cultivado en un fotobiorreactor de membrana utilizando lixiviado de vertederos a concentraciones de 10 y 20%, Zhao et al. (2014) realizó estudios utilizando mezclas de agua residual doméstica enriquecida con lixiviado al 0, 5%, 10%, 15%



y 20%, alcanzando una productividad máxima de  $24.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de lípidos *Chlorella pyrenoidosa*, mientras que para la especie *Scenedesmus sp.* Nayak et al. (2016) reportó un rendimiento máximo de 33.3% de lípidos utilizando agua residual filtrada y estéril como medio de cultivo, en todos los estudios antes mencionados se han empleado pretratamientos físicos y químicos para disminuir la toxicidad de los lixiviados, así como la mezcla o reacondicionamiento con aguas residuales, por lo que la optimización del lixiviado y su uso crudo sin pretratamientos puede representar una opción viable para el cultivo de las microalgas, tomando en cuenta que su cultivo se puede utilizar como tratamiento para la recuperación de nutrientes como nitrógeno y fósforo y la bioconversión de metabolitos de interés como son los lípidos (Ortiz et al., 2023).

Otro aspecto importante que resaltar es que la acumulación de lípidos en el sistema abierto reflejó la importancia de la exposición a la luz natural durante el metabolismo mixotrófico, ya que se permite que la microalga utilice todo el espectro de luz visible para la fotosíntesis, la cual se encuentra a una longitud de onda de 400 a 700 nm (Atta et al., 2013) y es compatible con el espectro de absorción fotosintética activa de las microalgas verdes, mientras que en los FBRs la luz empleada fue con los diodos emisores de luz (LED), estas se consideran la fuente de luz artificial más eficiente en comparación con otras fuentes de luz artificial (Bialevich et al., 2022). Sin embargo, los LED tienen un espectro de luz estrecho, que, si bien pueden incluir un amplio rango del espectro de luz solar, su eficiencia con el espectro de absorción fotosintética varía del 80-100% (Metsoviti et al., 2019; Glemser et al., 2016; Schulze et al., 2014). Tal como demostró Sobolewska et al. (2023) utilizando lixiviado de digestor como medio de cultivo, quien reportó una mayor densidad de biomasa de *Microglena sp.* y *Tetrademus obliquus* (antes *Scenedesmus obliquus*) y remoción de nutrientes, cuando el fotobiorreactor se expuso únicamente a luz solar en comparación con el fotobiorreactor que utilizó luz LED como iluminación. Otro estudio realizado por Bialevich et al. (2022) demostró que el incremento en la intensidad luminosa de luces LED quienes evaluaron tres intensidades de luz ( $100, 250$  y  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) valores que están muy por encima de los utilizados en este trabajo ( $46.25$  y  $64.75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), sin embargo, en sus resultados se demostró que el incremento en la intensidad de luz no mejoró el crecimiento ni la densidad celular ya que el cultivo se acercaba a su intensidad de saturación de luz. Es importante mencionar que la intensidad de la luz por debajo del umbral



inferior no permite un crecimiento eficiente, mientras que la intensidad de la luz por encima del umbral superior dañará la célula y ralentizará o incluso impedirá un mayor crecimiento (Da Silva et al., 2017; Bialevich et al., 2022).

En el caso de los FBRs resulta interesante buscar la eficiencia de cada sistema optimizando la geometría de los mismos, con el objetivo de reducir costos de producción reemplazando la luz artificial por la luz natural, de tal manera que se optimice la eficiencia de la luz en el cultivo de algas (Huang et al., 2014).

En la tabla 7 se observa la comparación de los tratamientos y sistemas de cultivo evaluados, en donde se comparan las variables más importantes en el crecimiento de *Scenedesmus acutiformis* bajo condición mixotrófica, tales como la densidad inicial y la densidad celular final a los 30 días de evaluación, así como la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación, finalmente se observa el rendimiento de la biomasa seca y de la acumulación de lípidos. Es posible apreciar a partir de este análisis que los tratamientos con mayor concentración de lixiviado lograron mayor productividad en cada una de las variables evaluadas.

Tabla 7. Comparación de tratamientos y sistemas de cultivo en la productividad de *Scenedesmus acutiformis* en condición mixotrófica.

Concentración lixiviado	Nivel de iluminación (Lux)	Tratamiento	Densidad celular inicial (Cel mL <sup>-1</sup> )	Densidad celular final (Cel mL <sup>-1</sup> )	$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	Td (día <sup>-1</sup> )	Biomasa seca (mg L <sup>-1</sup> )	Rendimiento de lípidos %
15	2500	T1	1.3X10 <sup>3</sup> ±0.17 <sup>a</sup>	1.4 X10 <sup>6</sup> ±0.15 <sup>h</sup>	0.11± 0.02 <sup>g</sup>	6.15 ±0.03 <sup>c</sup>	65.15 ±0.01 <sup>i</sup>	12.9 ± 2.01 <sup>i</sup>
	3500	T4	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	7.6 X10 <sup>5</sup> ±0.09 <sup>i</sup>	0.20 ±0.19 <sup>e</sup>	3.43 ±0.1 <sup>e</sup>	31.08 ±0.01 <sup>j</sup>	18.3 ± 0.01 <sup>h</sup>
25	2500	T2	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.18 <sup>a</sup>	2.7 X10 <sup>6</sup> ±0.03 <sup>g</sup>	0.06 ±0.07 <sup>h</sup>	11.50 ±0.09 <sup>b</sup>	196.13 ±0.10 <sup>g</sup>	12.7 ± 0.02 <sup>i</sup>
	3500	T5	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.11 <sup>a</sup>	1.1 X10 <sup>6</sup> ±0.01 <sup>h</sup>	0.06 ±0.04 <sup>h</sup>	11.64 ±0.05 <sup>b</sup>	111.73 ±0.02 <sup>g</sup>	17.2 ± 0.04 <sup>h</sup>
50	2500	T3	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.14 <sup>a</sup>	2.8 X10 <sup>6</sup> ±0.07 <sup>g</sup>	0.05 ±0.08 <sup>i</sup>	15.15 ±0.01 <sup>a</sup>	526.83 ±0.03 <sup>c</sup>	25.3 ± 1.01 <sup>f</sup>
	3500	T6	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	3.6 X10 <sup>6</sup> ±0.16 <sup>e</sup>	0.12±0.06 <sup>g</sup>	5.81 ±0.12 <sup>c</sup>	582.63 ±0.07 <sup>d</sup>	28.7 ± 0.03 <sup>f</sup>
15	2500	P1	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	4.0 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>e</sup>	0.06±0.01 <sup>h</sup>	11.35±0.25 <sup>b</sup>	182.38±0.02 <sup>g</sup>	21.03±0.4 <sup>g</sup>
	3500	P4	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	7.2 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>c</sup>	0.46±0.29 <sup>b</sup>	1.51±0.14 <sup>g</sup>	204.78±0.06 <sup>g</sup>	33.62±0.11 <sup>e</sup>
25	2500	P2	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.11 <sup>a</sup>	3.9 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>e</sup>	0.23±0.15 <sup>d</sup>	2.49±.13 <sup>f</sup>	224.88±0.00 <sup>g</sup>	34.15±0.12 <sup>e</sup>
	3500	P5	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	7.9 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>c</sup>	0.40±0.29 <sup>c</sup>	1.72±0.15 <sup>g</sup>	250.58±0.04 <sup>f</sup>	34.58±0.06 <sup>e</sup>
50	2500	P3	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.13 <sup>a</sup>	4.8 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>d</sup>	0.15±0.06 <sup>f</sup>	4.55±0.26 <sup>d</sup>	408.00±0.04 <sup>e</sup>	37.22±0.08 <sup>d</sup>
	3500	P6	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.16 <sup>a</sup>	1.7 X10 <sup>7</sup> ±0.10 <sup>a</sup>	0.57±0.22 <sup>a</sup>	1.21±0.64 <sup>g</sup>	693.90±0.12 <sup>b</sup>	43.65±0.01 <sup>c</sup>
15		A1	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	2.2 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>g</sup>	0.20±0.01 <sup>e</sup>	2.14±0.13 <sup>f</sup>	369.9±0.11 <sup>d</sup>	43.95±0.05 <sup>c</sup>
25	NA	A2	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.11 <sup>a</sup>	1.1 X10 <sup>7</sup> ±0.10 <sup>b</sup>	0.10±0.29 <sup>g</sup>	6.46±0.15 <sup>c</sup>	453.6±0.01 <sup>d</sup>	47.31±0.13 <sup>b</sup>
50		A3	1.3 X10 <sup>3</sup> ±0.12 <sup>a</sup>	3.0 X10 <sup>6</sup> ±0.10 <sup>f</sup>	0.41±0.03 <sup>c</sup>	1.4±0.06 <sup>g</sup>	776.24±0.07 <sup>a</sup>	51.97±0.07 <sup>a</sup>

\* Promedio de tres repeticiones \*\*Promedio (± error estándar) letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (P < 0.05). NA: no aplica.

#### 4.5 Caracterización de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de *Scenedesmus acutiformis*

En la tabla 8 se observa el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus acutiformis* obtenido a partir de FBR de columna, dentro de los cuales se observan cadenas de carbono que van de 16 a 18 carbonos. El 48.06% de los ácidos grasos identificados corresponden a ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido linolénico (C18:3) y ácido linoleico (C18:2) los que se encuentran en esta composición, así mismo, se encontró que el 17.93% son ácidos grasos monoinsaturados, dentro de los cuales se encuentra el ácido oleico (C18:1) y el ácido palmitoleico (C16:1), mientras que el 33.9% corresponde a ácidos grasos saturados.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de *Scenedesmus acutiformis* cultivado en lixiviado de lombricomposta en FBR de columna.

N.	Componentes	Fórmula química	Parent ion (m/z) <sup>2</sup>	Tiempo de retención <sup>1</sup> (min)	Ácidos grasos	Porcentaje de abundancia (%)
1	Ácido linolénico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278,43	16.76	Poliinsaturado	27.01
2	Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,44	18.57	Poliinsaturado	17.05
3	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,43	14.56	Saturado	16.46
4	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284,48	11.36	Saturado	14.7
5	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282.47	19.31	Monoinsaturado	12.75
6	Ácido palmitoleico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254,41	13.01	Monoinsaturado	3.69
Ácidos grasos saturados (SFA <sub>s</sub> )						33.99
Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA <sub>s</sub> )						17.93
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA <sub>s</sub> )						48.06

En la tabla 9 se muestran los resultados de obtenidos en la caracterización de los lípidos extraídos del FBR de placa plana, en donde el perfil lipídico mostró una composición de 78.8% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), siendo el más abundante el ácido linolénico (C18:3), seguido del ácido linoleico (C18:2) y ácido eicosadienóico (21:2), también se observó un 21.1% ácidos grasos monoinsaturados (MUFA<sub>s</sub>), siendo el más abundante el ácido palmitoleico (C16:1) seguido del ácido oleico (C18:1). Los ácidos grasos encontrados constan de cadenas de carbono que van de 16 a 21 carbonos.

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de *Scenedesmus acutiformis* cultivado en lixiviado de lombricomposta en FBR de placa plana.

N.	Componentes	Fórmula química	Parent ion (m/z) <sup>2</sup>	Tiempo de retención <sup>-1</sup> (min)	Ácidos grasos	Porcentaje de abundancia (%)
1	Ácido linolénico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278,43	19.88	Poliinsaturado	46.9
2	Ácido eicosadienóico	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	280,44	21.45	Poliinsaturado	6.92
3	Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	284,48	18.93	Poliinsaturado	25.04
4	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,47	17.73	Monoinsaturado	6.87
5	Ácido palmitoleico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254,41	15.72	Monoinsaturado	14.25
Ácidos grasos saturados (SFA <sub>s</sub> )						NA
Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA <sub>s</sub> )						21.12
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA <sub>s</sub> )						78.86

Así mismo, en la tabla 10 se observa la composición de ácidos grasos encontrados en el aceite producido en el sistema de cultivo abierto, el cual corresponde a una composición de 80.13% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), siendo el más abundante el ácido linolénico (C18:3), seguido del ácido linoleico (C18:2) y ácido eicosadienóico (21:2), también se observó un 19.8% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), siendo el más abundante el ácido palmitoleico (C16:1), seguido del ácido oleico (C18:1). Se observa que la composición de los ácidos grasos encontrados en el FBR de placa plana y el sistema abierto presentan una abundancia similar, los ácidos grasos constan de cadenas de carbono que van de 16 a 21 carbonos. Es importante recordar que la acumulación de lípidos mostró un mayor rendimiento entre los tratamientos de mayor concentración de lixiviado, además de que el perfil de ácidos grasos fue realizado con los lípidos obtenidos a una concentración de 50%.

Tabla 10. Perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de *Scenedesmus acutiformis* cultivado en lixiviado de lombricomposta en un sistema de cultivo abierto.

N.	Componentes	Fórmula química	Parent ion (m/z) <sup>2</sup>	Tiempo de retención <sup>-1</sup> (min)	Ácidos grasos	Porcentaje de abundancia (%)
1	Ácido linolénico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278,43	19.88	Poliinsaturado	48.51
2	Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,44	18.33	Poliinsaturado	25.35
3	Ácido eicosadienóico	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	284,48	21.45	Poliinsaturado	6.27



4	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	282.47	17.73	Monoinsaturado	5.75
5	Ácido palmitoleico	$C_{16}H_{30}O_2$	254,41	15.72	Monoinsaturado	14.1
Ácidos grasos saturados (SFA <sub>s</sub> )						NA
Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA <sub>s</sub> )						19.85
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA <sub>s</sub> )						80.13

La figura 20 muestra el cromatograma de los compuestos identificados, en donde se visualiza el tiempo de retención respecto a la abundancia presente en la muestra, estos picos de identificación fueron interpretados a partir del estándar CRM47885 (Certificado de Análisis - Material de Referencia Certificado Supelco Mezcla de Componente FAME 37).

Los resultados obtenidos en el FBR de columna coinciden con lo reportado por El-Sheekh et al. (2018) quien identificó el perfil de ácidos grasos de morfotipos correspondientes a diferentes especies de *Scenedesmus*, demostrando una abundancia de ácidos grasos poliinsaturados de 44.22%, 18,05% para ácidos grasos monoinsaturados y 37.73% para ácidos grasos saturados, lo que indica que el equilibrio en la composición de ácidos saturados y ácidos grasos insaturados determinan la buena calidad del biodiesel, reduciendo su oxidación y su viscosidad y características de fluidez a bajas temperaturas. Por otro lado, en el FBR de placa plana y el sistema de cultivo abierto se puede observar una mayor abundancia de ácidos grasos poliinsaturados 78 y 80% respectivamente, mientras que se observa una abundancia de 21 y 19% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) respectivamente. Es importante mencionar que las características estructurales de los ácidos grasos; como la longitud de la cadena y el grado de insaturación; también influyen significativamente en las propiedades físicas y químicas del biodiésel, las cuales están determinadas principalmente por sus ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) (Volgusheva et al., 2022). El grado de insaturación juega un papel importante en las propiedades del combustible, cuanto mayor sea el grado de insaturación de los FAME, mayor será la tendencia a la oxidación del biodiesel (Zhao et al., 2019), sin embargo, los ácidos grasos más cortos y más insaturados aumentan las características de viscosidad y flujo a bajas temperaturas, que son características indeseables, por lo tanto, se debe mantener una proporción adecuada entre grasas saturadas e insaturadas para obtener biodiesel con características apropiadas (Tripathi et al., 2021).

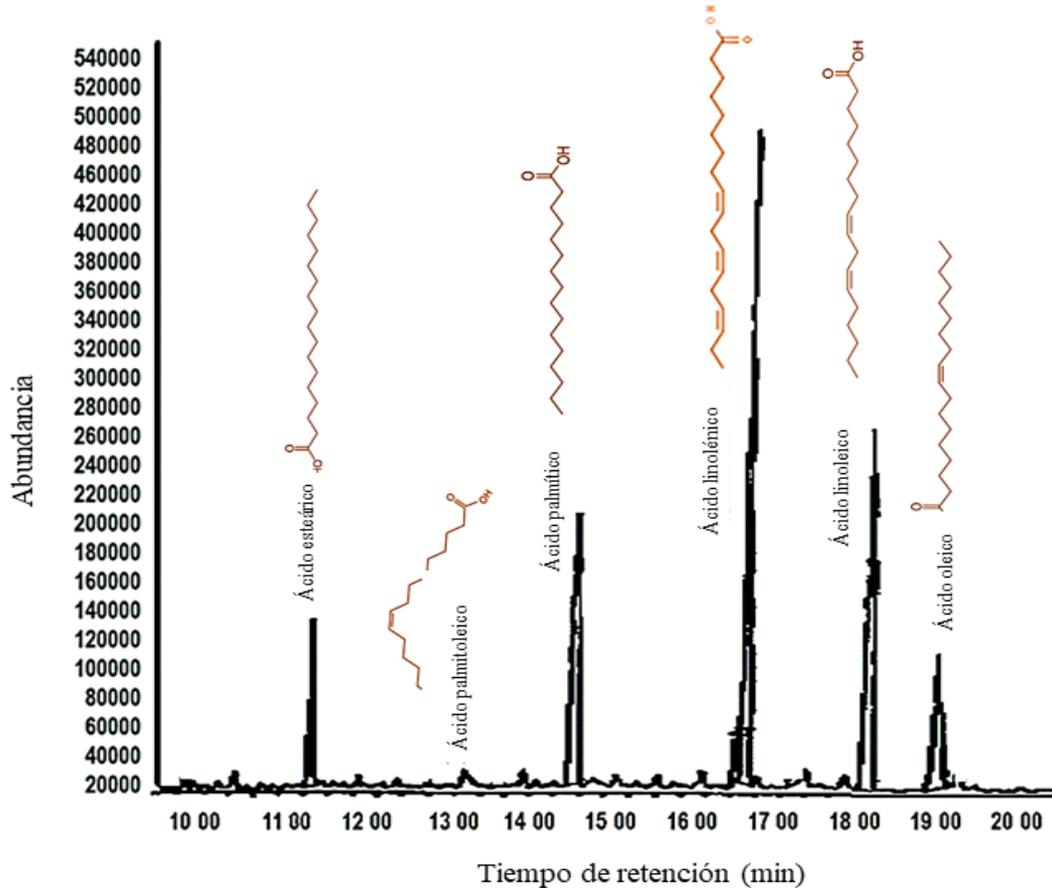


Figura 20. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de *Scenedesmus acutiformis* propagado en lixiviado de lombricomposta como condición mixotrófica, mediante espectroscopía de masas por cromatografía de gases (GCMS).

Los resultados actuales revelaron que los ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) de *S. acutiformis* fue 33,99 y 17,93 % de los ácidos grasos totales, del FBR de columna (tabla 8), cumple con las especificaciones de estándar europeo EN 14214 y la norma ASTM Biodiesel D 6751, por lo que su uso en la obtención de biodiesel daría lugar a un biodiesel con una estabilidad oxidativa aceptable (Vignesh et al., 2021), además, la conversión de triglicéridos en FAME a través del proceso de transesterificación podría reducir la viscosidad del mismo. Mientras que para el FBR de placa plana y el sistema abierto la composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) constituyen el 80% de los ácidos grasos totales, encontrándose un 20% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), los ácidos grasos y los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) con 4 o más enlaces dobles son susceptibles a la oxidación durante el



almacenamiento y esto reduce su aceptabilidad para su uso en biodiésel (Chisti, 2007), así mismo, la norma europea EN 14214 limita el contenido de éster metílico de ácido linolénico en el biodiésel para uso en vehículos al 12 %, sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) encontrados en el perfil de ácidos grasos se observa que la insaturaciones están por debajo de 4 (ácido linolénico (C18:3), ácido linoleico (C18:2) y ácido eicosadienóico (21:2), por lo que estos ácidos grasos tienen una mayor estabilidad oxidativa (Chisti, 2007), además de que se puede reducir el grado de insaturación del aceite de microalgas mediante la hidrogenación catalítica parcial del aceite (Jang et al., 2005; Dijkstra, 2006). Otro aspecto importante es que al tener un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados le confiere al biodiésel que se obtiene por transesterificación una mejora en las propiedades del combustible, como la viscosidad, la fluidez y la reducción de contenido de sólidos insolubles (Andeden et al., 2021; Mier y Fajardo, 2012). Finalmente, una de las características más importantes del biodiesel es el número de carbonos (C) en la estructura, cuanto más largas son las cadenas de carbono de los ácidos grasos, más moléculas saturadas presentes en el biodiesel se obtienen (Kokkinos et al., 2015). Es por todo lo anterior que los lípidos obtenidos de la biomasa de *S. acutiformis* representan una alternativa para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos de calidad de acuerdo con las especificaciones de estándar europeo EN 14214 y la norma ASTM Biodiesel D 6751, sin embargo, es necesario determinar parámetros de calidad en el biodiesel obtenido a partir de estos ácidos grasos.

#### **4.6 Optimización de las variables de producción de lípidos de *Scenedesmus acutiformis***

Se realizó un análisis de superficie respuesta (RSM) para optimizar las variables de producción de lípidos de la biomasa microalgal de *Scenedesmus acutiformis* evaluadas a nivel de tres sistemas de cultivo, dos FBRs y un sistema abierto, así como evaluar su sensibilidad a los factores de los tratamientos, el análisis se llevó a cabo con el software Minitab Statistical Software 22, la variable respuesta utilizada fue el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos (FAME).



En las tablas 11 y 12 se observa el análisis de varianza  $p < 0.05$ , en los cuales se muestra que existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones de lixiviado evaluadas (15, 25 y 50%), así mismo existe diferencia estadística significativa entre los sistemas de cultivo, mientras que las interacciones entre las dos variables no son significativas.

Tabla 11. Análisis de la varianza modelo lineal para determinar la optimización de la producción de lípidos

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	6	1415.09	235.848	27.35	0.036
Lineal	3	1335.88	445.295	51.64	0.019
%Lix	1	176.04	176.042	20.42	0.046
S	2	1159.84	579.921	67.25	0.015
Cuadrado	1	0.04	0.036	0.00	0.954
%Lix*%Lix	1	0.04	0.036	0.00	0.954
Interacción de 2 factores	2	7.65	3.823	0.44	0.693
%L*S	2	7.65	3.823	0.44	0.693
Error	2	17.25	8.623		
Total	8	1432.34			

RSM con un  $\alpha = 0.05$

Tabla 12. Análisis de la varianza modelo cuadrático para determinar la optimización de la producción de lípidos.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	4	1407.44	351.861	56.54	0.001
Lineal	3	1397.91	465.970	74.88	0.001
%Lix	1	176.04	176.042	28.29	0.006
S	2	1221.87	610.934	98.18	0.000
Cuadrado	1	0.04	0.036	0.01	0.943
%Lix*%Lix	1	0.04	0.036	0.01	0.943
Error	4	24.89	6.223		
Total	8	1432.34			

RSM con un  $\alpha = 0.05$



En la figura 21 se observa el diagrama de Pareto estandarizada para eficiencia en la producción de lípidos, en donde el factor A, corresponde a los tres niveles de concentración de lixiviado (15, 25 y 50%), mientras que el factor B corresponde a los sistemas de cultivo (1: FBR placa plana, 2: FBR de columna, 3: cultivo abierto).

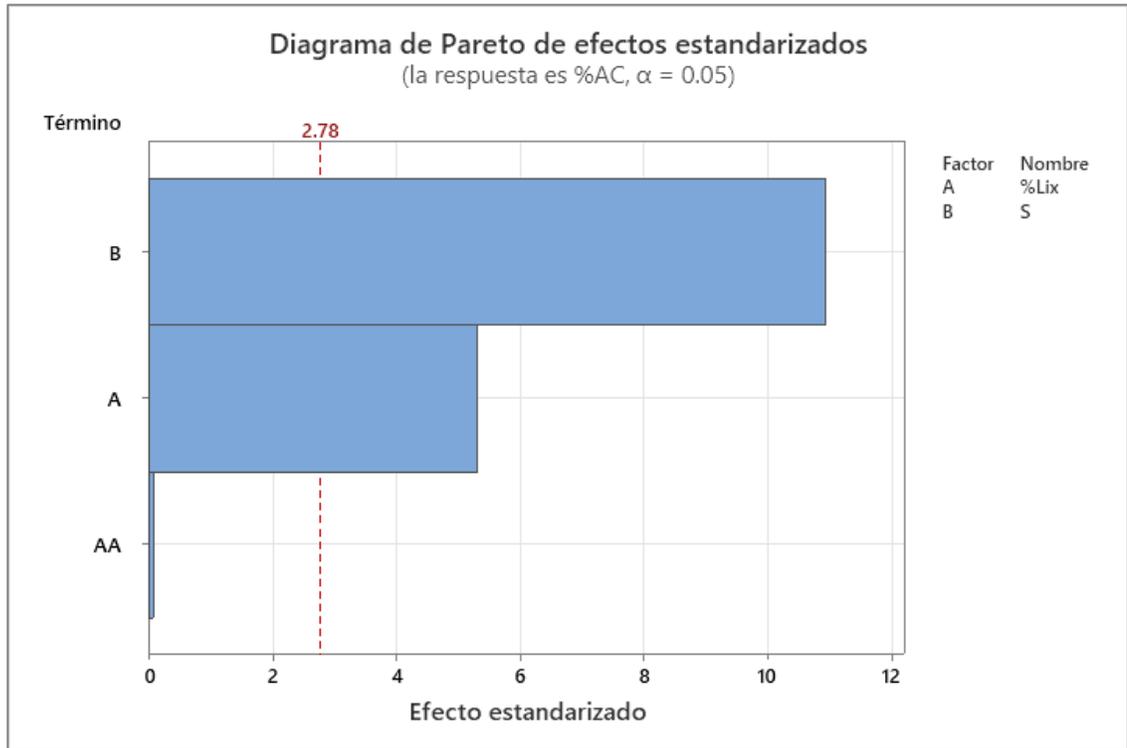


Figura 21. Diagrama de Pareto estandarizada para eficiencia en la producción de lípidos.

Los efectos estimados para la eficiencia en cada sistema de cultivo se observan en las siguientes ecuaciones de ajuste.

$$1 \quad \%AC = 9.42 + 0.345 \%Lix - 0.00055 \%Lix * \%Lix$$

$$2 \quad \%AC = 24.25 + 0.345 \%Lix - 0.00055 \%Lix * \%Lix$$

$$3 \quad \%AC = 37.95 + 0.345 \%Lix - 0.00055 \%Lix * \%Lix$$

En la figura 22 se observa que la región óptima de producción de lípidos (%AC) observada en la función de la concentración de lixiviado (%lix) y del sistema de cultivo se encuentra a mayor concentración de lixiviado (50%) y en el sistema de cultivo abierto (3). Tal como se observa en la ecuación de regresión del modelo lineal, las variables que influyen y son significativas en el rendimiento de lípidos son la concentración de lixiviado y el sistema de cultivo. Por lo que la optimización de la producción de lípidos de *Scenedesmus acutiformis* se encuentra en la implementación de un sistema de cultivo abierto (raceway), utilizando como medio de cultivo lixiviado de lombricomposta a una concentración de 25 a 50%, pudiéndose obtener un máximo rendimiento en la concentración de 50% de lixiviado.

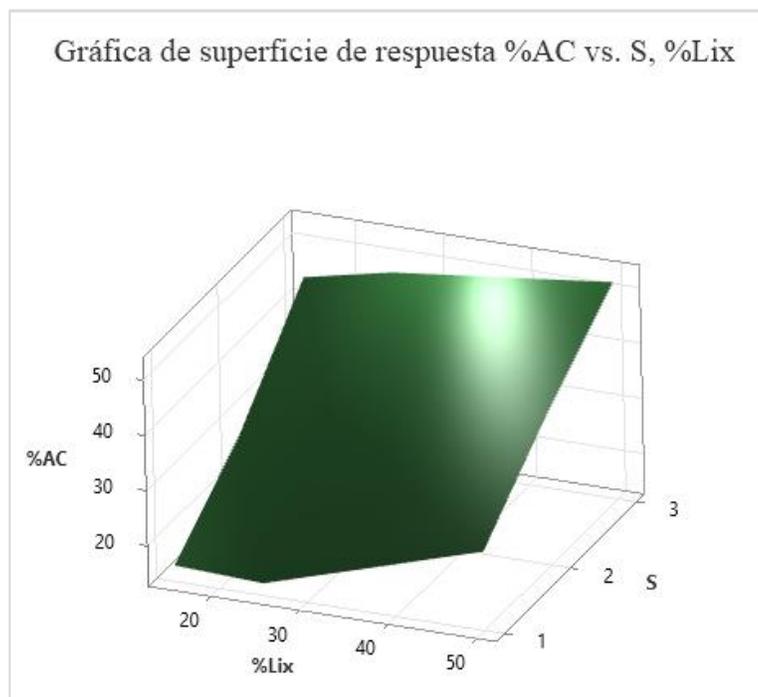


Figura 22. Superficie respuesta estimada para optimizar la productividad de *Scenedesmus acutiformis*. %AC = porcentaje de aceite, S = sistema de cultivo (1: FBR de columna, 2: FBR de placa plana, 3: sistema abierto), %Lix = porcentaje de lixiviado.



## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo y caracterizó el lixiviado de lombricomposta como medio de cultivo para microalgas, encontrándose una mayor concentración de P y baja concentración de N, 8.02 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente, estas concentraciones de N suponen una limitación en el cultivo por lo que se induce la síntesis de lípidos con potencial para biodiesel. Así mismo, se demostró que es posible utilizar el lixiviado crudo y en concentraciones de hasta 50% sin presentar un efecto tóxico para las microalgas, también se demuestra la importancia de caracterizar tanto los materiales de la composta como el lixiviado con el objetivo de estandarizar el medio de cultivo.
2. Los dos fotoperiodos evaluados en los FBRs no mostraron diferencia estadística significativa, mientras que se demostraron mayores rendimientos de biomasa en los tratamientos del sistema abierto en donde se trabajó bajo la incidencia de luz solar, observándose un comportamiento similar en los niveles de iluminación, ya que no se encontró diferencia estadística significativa entre los fotoperiodos 16:08 y 12:12.
3. En el FBR de columna *S. acutiformis* obtuvo la máxima productividad de biomasa de 582.6 mg L<sup>-1</sup> y una acumulación de lípidos de 28.7% a los 30 días de evaluación, siendo los tratamientos T6 y T3 los que contienen la mayor productividad, los cuales se caracterizan por tener una concentración de 50% de lixiviado.
4. En el FBR de placa plana se observó una mayor productividad de biomasa y lípidos a los 30 días de evaluación en el tratamiento P6 y P3, ambos con 50% de lixiviado, alcanzando una productividad máxima de 643.6 mg L<sup>-1</sup> y una acumulación de lípidos de 43.6%, respectivamente.
5. En el sistema de cultivo abierto la máxima productividad de biomasa fue en el tratamiento A3 con 50% de lixiviado, alcanzando una productividad de 776.2 mg L<sup>-1</sup> y un rendimiento máximo de aceite de 51.9%.
6. La máxima densidad celular se alcanzó en los tratamientos de mayor concentración de lixiviado, alcanzando una máxima productividad de 1.7x10<sup>7</sup> Cel mL<sup>-1</sup> a los 30 días

de evaluación en el tratamiento P6, el cual corresponde al FBR de placa plana, con 50% de lixiviado y 3500 lux de iluminación, mientras que la menor densidad fue en el tratamiento T4, FBR de columna con 3500 lux de iluminación, alcanzándose una densidad máxima a los 30 días de  $7.6 \times 10^5$  Cel mL<sup>-1</sup>.

7. La productividad de biomasa seca osciló entre 31.08 a 776.2 mg L<sup>-1</sup>, siendo mayor en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado, la máxima productividad de biomasa seca fue en A3, sistema abierto con concentración de lixiviado de 50%, alcanzando una productividad de 776.2 mg L<sup>-1</sup>, mientras que la menor productividad fue en el FBR de columna en los tratamientos con concentración de 15% de lixiviado.
8. La productividad de lípidos osciló entre 12.7 a 51.9%, siendo mayor en los tratamientos con mayor concentración de lixiviado, así como una mayor productividad en el sistema de cultivo abierto, alcanzándose una acumulación máxima de 51.9% en el tratamiento A3. Estos resultados demuestran el cumplimiento de la hipótesis planteada, ya que la microalga *Scenedesmus acutiformis* demostró la capacidad de metabolizar, en condiciones mixotrófica a una concentración del 50% de lixiviado de lombricomposta, lípidos en concentraciones de 20 a 50% a escala fotobiorreactor.
9. Se logró la caracterización de los ácidos grasos acumulados por *S. acutiformis* en los tres sistemas de cultivos evaluados, encontrándose ácidos grasos de cadena larga de 16 a 21 carbonos. En el FBR de columna se observa una composición de 48% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), mientras que un 17% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), en el FBR de columna y el sistema abierto se encontró 80% de PUFAs y 20% de MUFAs, siendo el ácido graso más abundante es el linolénico C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> encontrándose en 27%. Los PUFAs contienen entre 2 y 3 insaturaciones. Es por todo lo anterior que los lípidos obtenidos de la biomasa de *S. acutiformis* representan una alternativa para la producción de calidad de ésteres metílicos de ácidos grasos de acuerdo a las especificaciones del estándar europeo EN 14214 y la norma ASTM Biodiesel D 6751.



10. El análisis de superficie respuesta mostró que la optimización del medio de cultivo depende de la concentración del lixiviado, entre más alta es, mayores rendimientos de producción pueden obtenerse, por otro lado, es posible ahorrar costos de producción en el mantenimiento de las condiciones del cultivo, ya que el sistema abierto presentó la mayor productividad de lípidos.



## TRABAJOS FUTUROS Y RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, es pertinente realizar y ampliar los estudios de algunos de los resultados obtenidos.

1. Realizar la prolongación del cultivo de microalgas por más de 30 días, ya que se ha demostrado que la mayor acumulación de lípidos se da en la fase estacionaria, esto permitiría una mayor acumulación de lípidos.
2. Establecer un sistema de cultivo abierto a mayor escala que trabaje de forma continua y que, a su vez permita obtener rendimientos superiores de aceite para evaluar los parámetros de calidad en el biodiesel obtenido a partir de estos ácidos grasos, tomando como referencia las especificaciones de estándar europeo EN 14214 y la norma ASTM Biodiesel D 6751.
3. Caracterizar y revalorizar la biomasa resultante posterior a la extracción de aceite de *S. acutiformis* con la finalidad de establecer el aprovechamiento integral de la biomasa y su posible aplicación en otras áreas de la industria.
4. Realizar un estudio de la factibilidad económica del escalamiento del cultivo de *S. acutiformis* en la modalidad de cultivo abierto utilizando como medio de cultivo lixiviado de lombricomposta.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acien, F.G., Fernandez, J. M., y Molina, E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Environmental Science Biotechnology*.
2. Aditya, L., Mahlia, T. I., Nguyen, L. N., Vu, H. P., & Nghiem, L. D. (2022). Microalgae-bacteria consortium for wastewater treatment and biomass production. *Science of The Total Environment*, 155871.
3. Albalate-Ramírez, A., Alcalá-Rodríguez, M.M., Miramontes-Martínez, L.R., Estrada-Baltazar, A., Galván-Arzola, U., López-Hernández, B.N., Rivas-García, P. (2023). The importance of substrate formulation on the hydrolysis process in anaerobic digestion: A numerical and experimental study. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 22, BiO239.
4. Andeden, E.E., Ozturk, S. & Aslim, B. Evaluación de treinta aislados de microalgas como materias primas de biodiésel en función de la productividad de lípidos y el contenido de triacilglicerol (TAG). *Curr Microbiol* 78, 775–788 (2021).
5. Amaro, H. M., Guedes, A. C. y Malcata, F. X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88(10): 3402–3410
6. Arias Peñaranda, M. T., Cañizares Villanueva, R. O., & Martínez Roldán, A. D. J. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*; Vol. 18, núm. 1 (2013); 43-68 *Acta Biológica Colombiana*; Vol. 18, núm. 1 (2013); 43-68.
7. Arutselvan, C., kumar Seenivasan, H., Oscar, F. L., Ramya, G., Chi, N. T. L., Pugazhendhi, A., & Thajuddin, N. (2022). Review on wastewater treatment by microalgae in different cultivation systems and its importance in biodiesel production. *Fuel*, 324, 124623.
8. Assunção, J. y Malcata, F. X. (2020). Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. *Algal Research*, 52, 102107.
9. Atta, M.; Idris, A.; Bujari, A.; Wahidin, S. Intensidad de la luz LED azul: Un estímulo potencial para la biomasa y el contenido de lípidos en la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 2013, 148, 373–378.



10. Bagchi, S. K., Patnaik, R., Sonkar, S., Koley, S., Rao, P. S., & Mallick, N. (2019). Qualitative biodiesel production from a locally isolated chlorophycean microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing GA 45 under closed raceway pond cultivation. *Renewable energy*, 139, 976-987.
11. Barceló-Villalobos, M., Hoyo, Á., Rodríguez-Miranda, E., Guzmán, J. L., & Acién, F. G. (2022). A new control strategy to improve the mass transfer capacity and reduce air injection costs in raceway reactors. *New Biotechnology*, 70, 49-56.
12. Beigbeder, J. B., & Lavoie, J. M. (2022). Effect of photoperiods and CO<sub>2</sub> concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 58, 101934.
13. Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., & López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427.
14. Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476-1493.
15. Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., & López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427.
16. Bialevich, V.; Zachleder, V.; Bišová, K. El efecto de la fuente de luz variable y la intensidad de la luz en el crecimiento de tres especies de algas. *Celdas* 2022, 11, 1293.
17. Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425–3431.
18. Bharadwaj, S. V. V., Ram, S., Pancha, I., & Mishra, S. (2020). Recent Trends in Strain Improvement for Production of Biofuels From Microalgae. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 211–225.



19. Bui, X. T., Nguyen, T. T., Ngo, H. H., Lin, K. Y. A., Lin, C., Le, L. T., ... & Varjani, S. (2022). Co-culture of microalgae-activated sludge in sequencing batch photobioreactor systems: Effects of natural and artificial lighting on wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 343, 126091.
20. Chang H, Feng H, Wang R, Zhang X, Wang J, Li C, et al. Enhanced energy recovery from landfill leachate by linking light and dark bio-reactions: Underlying synergistic effects of dual microalgal interaction. *Water Res.* 2023; 231:119578.
21. Chang H, Quan X, Zhong N, Zhang Z, Lu C, Li G, et al. High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. *Bioresour Technol.* 2018; 266:374-81.
22. Cheah WY, Ling TC, Show PL, Juan JC, Chang J-S, Lee D-J. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Appl Energy.* 2016; 179:609-25.
23. Cheirsilp, B., Srinuanpan, S., & Mandik, Y. I. (2020). Efficient harvesting of microalgal biomass and direct conversion of microalgal lipids into biodiesel. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Academic Press. 83-96.
24. Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., y Chang, J.-S. (2011). *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technology*, 102(1), 71–81.
25. Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., ... & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229, 53-62.
26. Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*, 44(5), 1813-1819.
27. Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2009, 48(6), 1146-1151.
28. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306.



29. Daneshvar, E., Zarrinmehr, M. J., Kousha, M., & Bhatnagar, A. (2020). Performance evaluation of different harvesting methods and cultivation media on the harvesting efficiency of microalga and their fatty acids profile. *Fuel*, 280, 118592.
30. Da Silva Ferreira, V.; Sant'Anna, C. Impacto de las condiciones de cultivo en el contenido de clorofila de las microalgas para aplicaciones biotecnológicas. *Mundo J. Microbiol. Biotecnología*. 2017, 33, 20.
31. De Alva, M. S., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., & Ortíz, E. (2013). Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource technology*, 146, 744-748.
32. Del Olmo, P. F., Ación, F. G., & Fernández-Sevilla, J. M. (2021). Analysis of productivity in raceway photobioreactor using computational fluid dynamics particle tracking coupled to a dynamic photosynthesis model. *Bioresource Technology*, 334, 125226.
33. Dijkstra AJ. Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 2006;108(3):249–64.
34. Ding, W., Jin, W., Zhou, X., Li, S. F., Tu, R., Han, S. F., ... & Huang, Y. (2020). Enhanced lipid extraction from the biodiesel-producing microalga *Chlorella pyrenoidosa* cultivated in municipal wastewater via *Daphnia* ingestion and digestion. *Bioresource Technology*, 123162.
35. Endalew, A. K., Kiros, Y., & Zanzi, R. (2011). Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. *Biomass and bioenergy*, 35(9), 3787-3809.
36. Fajardo Castro, D. J., y Londoño Sánchez, A. D. (2020). Desarrollo de un biorreactor de bajo costo para la disminución de los requerimientos de oxígeno externo en un consorcio alga-bacteria para la producción de Polihidroxialcanoatos (PHA) (Tesis grado, Fundación Universidad de América).
37. Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., & Badillo-Corona, J. A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101-115.
38. Fernández-Rodríguez, M. J., De la Lama-Calvente, D., Jiménez-Rodríguez, A., Borja, R., & Rincón-Llorente, B. (2019). Anaerobic co-digestion of olive mill solid



- waste and microalga *Scenedesmus quadricauda*: effect of different carbon to nitrogen ratios on process performance and kinetics. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3583-3591.
39. Flores, C. C., Castro, J. M. P., Cotera, L. B. F., & Villanueva, R. O. C. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8), 450-456.
  40. Glemser, M.; Heining, M.; Schmidt, J.; Becker, A.; Garbe, D.; Buchholz, R.; Bruck, T. Aplicación de diodos emisores de luz (LED) en el cultivo de microalgas fototróficas: estado actual y perspectivas. *Aplicación Microbiol. Biotecnología*. 2016, 100, 1077–1088.
  41. Grabska, N., Tamayo, A., Mazo, M. A., Pascual, L., & Rubio, J. (2015). Evaluación del comportamiento de vidrios lixiviados como nutrientes de algas. *boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*, 54(4), 166-174.
  42. Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2000). *Introduction to the algae*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River NJ, pp.1-20.
  43. Grández, K. M. B., Vargas, F. R. L., Ruiz, M. G., & Herrera, C. J. (2020). Influencia del nitrógeno en el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp.(alga verde). *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 8(2), 141-150.
  44. Guieysse, B., & Plouviez, M. (2021). Sustainability of microalgae cultivation. *Cultured Microalgae for the Food Industry*, 343–365.
  45. Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol*, 2009, 21, 493–507.
  46. Härtig, C. (2008). Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography–mass spectrometry database. *Journal of chromatography A*, 1177(1), 159-169.
  47. He, L., Wu, S. G., Wan, N., Reding, A. C., & Tang, Y. J. (2015). Simulating cyanobacterial phenotypes by integrating flux balance analysis, kinetics, and a light distribution function. *Microbial cell factories*, 14(1), 1.
  48. Hernández-García A, Velásquez-Orta SB, Novelo E, Yáñez-Noguez I, Monje-Ramírez I, Orta Ledesma MT. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;174:435.



49. Hernández, J. G., Miranda, E. R., Sánchez, J. L. G., Fernández, F. G. A., & Visioli, A. (2022). Optimización de temperatura en reactores raceway para la producción de microalgas mediante regulación de nivel. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática industrial*, 19(2), 164-173.
50. Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
51. Hoeniges, J., Welch, W., Pruvost, J., & Pilon, L. (2022). A novel external reflecting raceway pond design for improved biomass productivity. *Algal Research*, 65, 102742.
52. Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M. A., & Mojica, L. (2019). Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 42, 101600.
53. Huancollo Chambi, E. Y. (2018). Evaluación de parámetros de cultivo y análisis de la composición nutricional de la microalga *Scenedesmus* sp endémica del lago Titicaca en condiciones de laboratorio.
54. Huang, J., Li, Y., Wan, M., Yan, Y., Feng, F., Qu, X., ... Wang, W. (2014). Novel flat-plate photobioreactors for microalgae cultivation with special mixers to promote mixing along the light gradient. *Bioresource Technology*, 159, 8–16. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.134
55. Hu D, Zhang J, Chu R, Yin Z, Hu J, Kristianto Nugroho Y., et al. (2021). Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* co-cultivation with landfill leachate for pollutant removal and lipid production. *Bioresour Technol*. 2021; 342:126003.
56. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., y Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67.
57. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*. 2008, 54(4):621-39.
58. Hu, R., Cao, Y., Chen, X., Zhan, J., Luo, G., Ngo, H. H., & Zhang, S. (2022). Progress on microalgae biomass production from wastewater phycoremediation: metabolic



- mechanism, response behavior, improvement strategy and principle. *Chemical Engineering Journal*, 137187.
59. Inostroza, C., Solimeno, A., García, J., Fernández-Sevilla, J. M., & Acién, F. G. (2021). Improvement of real-scale raceway bioreactors for microalgae production using Computational Fluid Dynamics (CFD). *Algal Research*, 54, 102207.
  60. Ishika, T., Moheimani, N. R., & Bahri, P. A. (2017). Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: a critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 78, 356-368.
  61. Jang ES, Jung MY, Min DB. Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids. *Comp Rev Food Sci Saf* 2005;4: 22–30.
  62. Karim, A., Islam, M. A., Khalid, Z. B., Faizal, C. K. M., Khan, M. M. R., & Yousuf, A. (2020). Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 129–147.
  63. Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-21.
  64. Koller, M. (2015). Design of closed photobioreactors for algal cultivation. In *Algal biorefineries* (pp. 133-186). Springer, Cham.
  65. Konca, Y., Buyukkilic, B. S., Ayaşan, T., Kaliber, M., & Bozkurt, K. A. (2016). The effects of freezing and supplementation of molasses and inoculants on chemical and nutritional composition of sunflower silage. *Asian-Australasian journal of animal sciences*.
  66. Korozi E, Kefalogianni I, Tsagou V, Chatzipavlidis I, Markou G, Karnaouri A. Evaluation of Growth and Production of High-Value-Added Metabolites in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* Grown on Crude Glycerol under Heterotrophic and Mixotrophic Conditions Using Monochromatic Light-Emitting Diodes (LEDs). *Foods*. 2023, 12(16):3068.
  67. Koutra, E., Tsafrakidou, P., Sakarika, M., & Kornaros, M. (2020). Microalgal Biorefinery. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 163–185.



68. Kraai, J. A., & Rorrer, G. L. (2022). High density cultivation and CO<sub>2</sub> uptake by panel arrays of the macrophytic red alga *Gracilaria vermiculophylla* in a 100 L raceway pond. *Algal Research*, 65, 102726.
69. Kumar, S., Cheng, J., Jia, D., Kubar, A. A., & Yang, W. (2022). Enhancing microalgae production by installing concave walls in plate photobioreactors. *Bioresource Technology*, 345, 126479.
70. Kumari, K., Samantaray, S., Sahoo, D. *et al.* Nitrogen, phosphorus and high CO<sub>2</sub> modulate photosynthesis, biomass and lipid production in the green alga *Chlorella vulgaris*. *Photosynth Res*, 2021, 148, 17–32.
71. Lam, M. K. y Lee, K. T. (2012). Biocombustibles de microalgas: una revisión crítica de temas, problemas y el camino a seguir. *Avances biotecnológicos*, 30(3), 673-690.
72. Leite, L. de S., dos Santos, P. R., & Daniel, L. A. (2020). Microalgae harvesting from wastewater by pH modulation and flotation: Assessing and optimizing operational parameters. *Journal of Environmental Management*, 254, 109825.
73. Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Biorrecurso. Technol.* 2011, 102(1), 123–129.
74. Lin L, Chan GYS, Jiang BL, Lan CY. Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste Manag.* 2007;27(10):1376-82.
75. Loera-Quezada, M., y Olguín, E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal*, 1(1), 91-116.
76. López, L., Bocanegra, J., & Malagón-Romero, D. (2015). Obtención de biodiesel por transesterificación de aceite de cocina usado. *Ingeniería y Universidad*, 19(1), 7-24.
77. Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus* abundans under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource technology*, 201, 222-229.
78. Manirafasha, E., Jiao, K., Zeng, X., Xu, Y., Tang, X., Sun, Y., ... Lu, Y. (2020). Processing of Microalgae to Biofuels. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 111–128.

79. Manzoni, M. M., Montenegro H. C., Martínez J. A. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica. *BioTecnología*, Año 2021, Vol. 25 No.5, 11-34.
80. Martínez-Ruiz, M., Molina-Vázquez, A., Santiesteban-Romero, B., Reyes-Pardo, H., Villaseñor-Zepeda, K. R., Meléndez-Sánchez, E. R., ... & Parra-Saldivar, R. (2022). Micro-algae assisted green bioremediation of water pollutants rich leachate and source products recovery. *Environmental Pollution*, 306, 119422.
81. Maroneze, M. M., & Queiroz, M. I. (2018). Microalgal production systems with highlights of bioenergy production. In *Energy from microalgae* (pp. 5-34). Springer, Cham.
82. Meher, L. C., Vidya Sagar, D. & Naik, S. N. (2006). "Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10: 248-268.
83. Meng, T. K., Kassim, M. A., & Cheirsilp, B. (2020). Mixotrophic Cultivation: Biomass and Biochemical Biosynthesis for Biofuel Production. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 51–67.
84. Metsoviti, M.N.; Papapolymerou, G.; Karapanagiotidis, I.T.; Katsoulas, N. Efecto de la intensidad y la calidad de la luz sobre la tasa de crecimiento y la composición de *Chlorella vulgaris*. *Plantas* 2019, 9, 31.
85. Mier, M.A.M., Vargas, F.E.S y Fajardo, C.A.G. (2012). Producción y caracterización de biodiesel a partir de aceite de pollo. *Informador técnico*, (76), 62-7.
86. Míguez, J. L., Porteiro, J., Pérez-Orozco, R., Patiño, D., & Rodríguez, S. (2018). Evolution of CO<sub>2</sub> capture technology between 2007 and 2017 through the study of patent activity. *Applied energy*, 211, 1282-1296.
87. Mofijur, M., Rahman, S. A., Nguyen, L. N., Mahlia, T. M. I., & Nghiem, L. D. (2022). Selection of microalgae strains for sustainable production of aviation biofuel. *Bioresource Technology*, 345, 126408.
88. Molina, G. E., Fernández, J., Ación, F. G., Chisti, Y. (2011). Tubular photobioreactor desing for algae cultures. *Journal of Biotechnology*, 92, 113-131.



89. Montero-Sánchez, Y., Gallo, A., Gómez, L. M., Álvarez, I., Sabina, L. C., Támbara, Y., ... y Ramírez, L. R. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Investigación y Saberes*, 1(2), 37-43.
90. Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., Kyndt, J., & Martínez, A. (2015). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 1-9.
91. Moreno-García, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
92. Morillas-España, A., Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Ación-Fernández, F. G., Rodríguez-Miranda, E., Gómez-Serrano, C., & González-López, C. V. (2021). Year-long evaluation of microalgae production in wastewater using pilot-scale raceway photobioreactors: Assessment of biomass productivity and nutrient recovery capacity. *Algal Research*, 60, 102500.
93. Mu, D., Xin, C., & Zhou, W. (2020). Life Cycle Assessment and Techno-Economic Analysis of Algal Biofuel Production. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 281–292.
94. Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., ... & Nascimento, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, 6(1), 1-13.
95. Nayak M, Karemore A, Sen R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO<sub>2</sub> biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Res.* 2016; 16:216-23.
96. Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 107650.
97. Nordin, N., Yusof, N. y Samsudin, S. Producción de biomasa de *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Oscillatoria* sp. en lixiviados de vertederos nitrificados. Valor de biomasa residual 8, 2301–2311 (2017).



98. O'fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1511-1521.
99. Oliveira, O., Giancesella, S., Silva, V., Mata, T., & Caetano, N. (2017). Lipid and carbohydrate profile of a microalga isolated from wastewater. *Energy Procedia*, 136, 468-473.
100. Oliveira, C. Y. B., D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R., Lopes, R. G., & Derner, R. B. (2020). Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga *Choricystis minor* var. *minor*. *Science of The Total Environment*, 143476.
101. Olivieri, G., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2014). Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: configurations, operating strategies and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(2), 178-195.
102. Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11-20.
103. Ortega, G.C.C., Mercado, E.R.A., y Arrieta, B.M.C. (2014). Transesterificación de aceites vegetales empleando catalizadores heterogéneos. *Prospectiva*, 12(2), 90-104.
104. Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11-20.
105. Ortiz-Alvarez, M. D., Barajas-Ferreira, C., García-Martínez, J. B., Barajas-Solano, A. F., & Machuca-Martínez, F. (2023). Análisis bibliométrico de cultivos de microalgas en lixiviados de relleno sanitario. *Ingeniería y competitividad*, 25(2).
106. Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35-42.



107. Pawlowski, A., Guzmán, J. L., Berenguel, M., & Acién, F. G. (2019). Control System for pH in Raceway Photobioreactors Based on Wiener Models. *IFAC-PapersOnLine*, 52(1), 928–933.
108. Peralta-Ruiz, Y. Y., Cárdenas, Y. P., Romero, H. D. C., & Kafarov, V. (2012). Implementación de la metodología de síntesis y análisis de procesos a la etapa de cosecha de microalgas para la producción de biodiesel. *Prospectiva*, 10(1), 132-144.
109. Pereira SFL, Gonçalves AL, Moreira FC, Silva TFCV, Vilar VJP, Pires JCM. Nitrogen removal from landfill leachate by microalgae. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1926.
110. Pereira, F. M., Loures, C. C. A., Amaral, M. S., Gomes, F. M., Pedro, G. A., Machado, M. A. G., ... Silva, M. B. (2018). Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor. *Fuel*, 230, 155–162.
111. Pérez-García, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics. *Algal biorefineries*, 61-131.
112. Plata, V. P., Kafarov, V., & Moreno, N. (2009). Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospectiva*, 7(2), 35-41.
113. Polat, E., Yüksel, E., & Altınbaş, M. (2020). Mutual effect of sodium and magnesium on the cultivation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides*. *Biomass and bioenergy*, 132, 105441.
114. Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., & Thajuddin, N. (2012). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.
115. Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Suneja, K. G. (2022). Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282-290.
116. Rugnini, L., Costa, G., Congestri, R., Antonaroli, S., Di Toppi, L. S., & Bruno, L. (2018). Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the



- green microalga *Desmodesmus* sp.: An integrated approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, 125, 45-51.
117. Ryu, K. H., Kim, B., & Lee, J. H. (2019). A model-based optimization of microalgal cultivation strategies for lipid production under photoautotrophic condition. *Computers & Chemical Engineering*, 121, 57-66.
118. Sánchez-Roque, Y., Luna, Y. P., Acosta, J. M., Vázquez, N. F., Sebastian, J. P., & Hernández, R. B. (2020). 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*, 19(1), 133-147.
119. Serejo, M. L., Morgado, M. F., García, D., González-Sánchez, A., Méndez-Acosta, H. O., & Toledo-Cervantes, A. (2020). Environmental resilience by microalgae. In *Microalgae cultivation for biofuels production* (pp. 293-315). Academic Press.
120. Schulze, P.S.; Barreira, L.A.; Pereira, H.G.; Perales, J.A.; Varela, J.C. Diodos emisores de luz (LEDs) aplicados a la producción de microalgas. *Tendencias Biotechnol.* 2014, 32, 422–430.
121. Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of technology management & innovation*, 6(1), 100-114.
122. Singh, A., Singh-Nigam, P. y Murphy, J. D. 2011. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology*. 102(1): 26-34
123. Sirohi, R., Pandey, A. K., Ranganathan, P., Singh, S., Udayan, A., Awasthi, M. K., ... & Sim, S. J. (2022). Design and applications of photobioreactors-A review. *Bioresource technology*, 126858.
124. Sniffen KD, Sales CM, Olson MS. Nitrogen removal from raw landfill leachate by an algae-bacteria consortium. *Water Sci Technol.* 2016;73(3):479-85.
125. Sobolewska, E., Borowski, S., & Nowicka-Krawczyk, P. (2023). Effect of solar and artificial lighting on microalgae cultivation and treatment of liquid digestate. *Journal of Environmental Management*, 344, 118445.



126. Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., & Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(3), 723-737.
127. Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Prasertsan, P., Kato, Y., & Asano, Y. (2018). Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renewable Energy*, 122, 507-516.
128. Tejada-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Facultad de Ingeniería*, 24(39), 43-54.
129. TMECC, 2002. Test Methods for the Examination of Composting and Compost. Composting Council, US, Bethesda, MD.
130. Toledo-Cervantes, A., Solórzano, G. G., Campos, J. E., Martínez-García, M., & Morales, M. (2018). Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnology reports*, 17, 16-23.
131. Velásquez Vásquez, S. G. (2010). Diseño, construcción y puesta en marcha de un fotobioreactor tubular para producir microalga *Chlorella* SP.
132. Vijayalakshmi, S., Anand, M., & Ranjitha, J. (2020). Microalgae-Based Biofuel Production Using Low-Cost Nanobiocatalysts. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 251–263.
133. Viruela, A., Aparicio, S., Robles, Á., Falomir, L. B., Serralta, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2021). Kinetic modeling of autotrophic microalgae mainline processes for sewage treatment in phosphorus-replete and-deplete culture conditions. *Science of The Total Environment*, 797, 149165.
134. Vo, H. N. P., Ngo, H. H., Guo, W., Nguyen, T. M. H., Liu, Y., Liu, Y., ... Chang, S. W. (2018). A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *Science of The Total Environment*.



135. Waqar, R., Kaleem, M., Iqbal, J., Minhas, L.A., Haris, M., Chalgham, W., Mumtaz, A.S. (2023). Kinetic and equilibrium studies on the adsorption of lead and cadmium from aqueous solution using *Scenedesmus* sp. *Sustainability* 15, 6024.
136. Weiss, A., & Schebek, L. (2021). The net energy ratio of microalgae biofuels production based on correlated cultivation parameters in flat plate photobioreactors. *Journal of Cleaner Production*, 287, 125073.
137. Wibisono, Y.; Agung Nugroho, W.; Akbar Devianto, L.; Adi Sulianto, A.; Roil Bilad, M. (2019). Microalgae in Food-Energy-Water Nexus: A Review on Progress of Forward Osmosis Applications. *Membrane* 2019, 9, 166.
138. Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., & Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
139. Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499-507.
140. Xu, J., Cheng, J., Xin, K., Xu, J., & Yang, W. (2020). Strengthening flash light effect with a pond-tubular hybrid photobioreactor to improve microalgal biomass yield. *Bioresource Technology*, 318, 124079.
141. Yang, F., Long, L., Sun, X., Wu, H., Li, T., Xiang, W. (2014). Optimization of medium using response surface methodology for lipid production by *Scenedesmus* sp. *Marine Drugs* 12, 1245-1257.
142. Yaqoubnejad, P., Rad, H. A., & Taghavijeloudar, M. (2021). Development a novel hexagonal airlift flat plate photobioreactor for the improvement of microalgae growth that simultaneously enhance CO<sub>2</sub> bio-fixation and wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, 298, 113482.
143. You, X., Yang, L., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Sustainability and carbon neutrality trends for microalgae-based wastewater treatment: A review. *Environmental Research*, 209, 112860.
144. Yousuf, A. (2020). Fundamentals of Microalgae Cultivation. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 1–9.



145. Zhan J, Rong J, Wan Q (2017) Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy* 42: 8505–8517.
146. Zhao X, Zhou Y, Huang S, Qiu D, Schideman L, Chai X, et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresour Technol.* 2014;156:322-8.
147. Zhou, W., Lu, Q., Han, P., & Li, J. (2020). Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 31–50.
148. Zhu, L., Hu, T., Li, S., Nugroho, Y. K., Li, B., Cao, J., ... & Hiltunen, E. (2020). Effects of operating parameters on algae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting and lipid extraction using metal sulfates as flocculants. *Biomass and Bioenergy*, 132, 105433.