



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LO ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN EXTERIORES
EMPLEANDO EFLUENTE ACUÍCOLA ESTÉRIL Y NO ESTÉRIL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.AMB. IRVING ANAYA AVENDAÑO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PAULA NATALIA ROBLEDO NARVÁEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. VERÓNICA VALADEZ ROCHA

TIERRA BLANCA, VER., 20 DE AGOSTO DEL 2023

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Paula Natalia Robledo Narváez

Profesor investigador del Instituto
Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

(Directora)



Dra. Verónica Valadez Rocha

Profesor investigador Instituto
Tecnológico de Boca del Rio.

(Codirectora)



Dra. Ana Line Vázquez Larios

Profesor investigador del Instituto
Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

(Asesora)




Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente

Profesor investigador Instituto
Tecnológico de Boca del Rio.

(Asesor)



ORDEN DE IMPRESIÓN

	INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA
	ORDEN DE IMPRESIÓN

FECHA: 22 DE AGOSTO DE 2023
DEPENDENCIA: SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
OFICIO NÚM: OFICIO No. ITSTB/SPeI/034
ASUNTO: ORDEN DE IMPRESIÓN


C. IRVING ANAYA AVENDAÑO
CANDIDATO (A) A TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

De acuerdo con los requisitos para la obtención del grado de los lineamientos para la operación de los estudios de posgrado de los Institutos Tecnológicos, dependientes del Tecnológico Nacional de México y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo respecto a su trabajo profesional titulado:

“Producción de biomasa microalgal en exteriores empleando efluente acuícola estéril y no estéril”

Comunico a Usted, que tienen la autorización, para que proceda a la impresión de su trabajo de tesis.


ATENTAMENTE


DRA. KARINA BUSTOS RAMIREZ
SUBDIRECTORA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Archivo

FORMATO DE ASIGNACIÓN DE FECHA DE ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL

	INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA
	FORMATO DE ASIGNACIÓN DE FECHA DE ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL

FECHA: 23 DE AGOSTO DE 2023
DEPENDENCIA: SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
OFICIO NÚM: OFICIO No. ITSTB/SPEI/007
ASUNTO: ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL

C. IRVING ANAYA AVENDAÑO
CANDIDATO (A) A TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

Por medio de la presente le informo, la fecha, hora y lugar en que se desarrollara su acto examen de grado:

Fecha: martes 29 de agosto de 2023

Hora: 11:00 a.m

Lugar: Sala de Titulación del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca

Cuyo jurado queda de la siguiente forma:

Presidente: Dra. Paula Natalia Robledo Narvaez
Secretaria: Dr. Verónica Valadez Rocha
Vocal: Dra. Ana Line Vazquez Larios
Vocal Suplente: Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente

Sin más por el momento quedo a tus apreciables órdenes.

ATENTAMENTE

DRA. KARINA BUSTOS RAMÍREZ
SUBDIRECTORA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

c.c.p. Departamento de Servicios Escolares para su elaboración correspondiente.
c.c.p. Archivo



DICTAMEN DE LA COMISI3N DICTAMINADORA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tierra Blanca Veracruz el día 04 del mes de Agosto del año 2023 el (la) que suscribe Irving Anaya Avendaño del programa de Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología del TecNM/Superior de Tierra Blanca, manifiesta que es el autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de DRA. Paula Natalia Robledo Narváez y cede los derechos del trabajo titulado “Producción de biomasa microalgal en exteriores empleando efluente acuícola estéril y no estéril”. al Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo.



Irving Anaya Avendaño

Nombre y firma

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS

C Irving Anaya Avendaño estudiante en el programa de Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Veracruz, como autor(a) de la tesis presentada y registrada para la obtención del título de Maestro en Ciencias con el título: “Producción de biomasa microalgal en exteriores empleando efluente acuícola estéril y no estéril”

dirigida por: DRA. Paula Natalia Robledo Narváez

Declaro que:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con lo establecido por el artículo 168 de la ley federal de derechos de autor.

Del mismo modo, asumo frente al TecNM/Superior de Tierra Blanca cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis.

Tierra Blanca, Veracruz, a 04 de Agosto de 2023



Irving Anaya Avendaño

Nombre y firma

Prueba Turnitin



Identificación de reporte de similitud. oid:20755:250759829

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis IAA.docx

AUTOR

Irving Anaya

RECuento DE PALABRAS

25637 Words

RECuento DE CARACTERES

136675 Characters

RECuento DE PÁGINAS

114 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

9.6MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 3, 2023 5:24 PM CST

FECHA DEL INFORME

Aug 3, 2023 5:26 PM CST

● 7% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base c

- 7% Base de datos de Internet
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossr
- 3% Base de datos de trabajos entregados

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Paula Natalia Robledo Narváez en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergía del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca (ITSTB), y la codirección de la Dra. Verónica Valadez Rocha en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías del Instituto Tecnológico de Boca del Rio y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca No. 779455 para posgrados en México.

DEDICATORIAS

A Dios

Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona; tu amor y tu bondad no tienen fin, todos mis logros que son resultado de tu ayuda, aprendo de mis errores y me doy cuenta de que los pones frente mío para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras.

A mi familia

Han sido la base de mi formación, cada uno de ustedes ha aportado grandes cosas a mi vida, son lo más sagrado que tengo en la vida, por ser siempre mis principales motivadores y los formadores de lo que ahora soy como persona, sin ustedes y sus consejos, su amor y su cariño, yo no habría llegado hasta donde estoy. Les agradezco por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca 779455 otorgada para poder realizar mis estudios de posgrado.

A mis directoras de tesis

Por la confianza otorgada para llevar a cabo este trabajo de investigación y desarrollar esta etapa de manera exitosa, a la Dra. Verónica Valadez Rocha, por su apoyo, indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este trabajo, a la Dra. Paula Natalia Robledo Narváez por nuevamente permitirme trabajar con usted, por guiarme e instruirme en este proceso con base en su experiencia y sabiduría.

A mis asesores

El Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente y la Dra. Ana Line Vázquez Larios, por su seguimiento, asistencia, apoyo, guiándome y compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo experimental y revisión de la presente investigación.

A mis amigos y compañeros

Que estuvieron presentes, en este sendero, por apoyarme en todo momento, a mis compañeros la maestra Flor Virginia, Juventino, Lorena e Ivonne, así como a todos los que forman y formaron parte del equipo MCABI.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	2
2.1 Condiciones de cultivo.....	3
1.1 Cinéticas de crecimiento	4
2.2 Producción y productividad	5
1.2 Ficorremediación.....	9
3 JUSTIFICACIÓN	15
4 HIPÓTESIS GENERAL	16
4.1 HIPÓTESIS ESPECÍFICA	16
5 OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivo específico.....	17
6 METODOLOGÍA	18
6.1 Fase 1. Caracterización del agua residual	18
6.1.1 Muestreo.....	18
6.1.2 Caracterización fisicoquímica.....	19
6.2 Fase 2. Evaluación de las condiciones de operación.....	19
6.2.1 Diseño de experimental.....	20
6.2.2 Extracción de lípidos.....	23
6.3 Fase 3. Implementación del modelo a la intemperie.....	23
7 RESULTADOS.....	24
7.1 Fase 1. Caracterización del agua residual	24
7.2 Fase 2. Evaluar las condiciones de operación.....	26
7.2.1 Análisis del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlamydomonas sp</i>	26
7.2.2 Determinación del efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento de <i>Chlamydomonas sp</i> controlado y a la intemperie	29
7.2.3 Determinación del efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> controlada y a la intemperie	33

7.2.4	Determinación de la producción y productividad de biomasa cultivada controlada y a la intemperie.....	37
7.2.5	Determinación de la producción y productividad lípidos cultivada controlada y a la intemperie.....	39
7.2.6	Ficorremediación en ambiente controlado y a la intemperie	43
7.3	Fase 3. Implementación del modelo a la intemperie.....	54
7.3.1	Determinación de la producción y productividad de biomasa a la intemperie	54
7.3.2	Determinación de la producción y productividad de lípidos a la intemperie.....	58
7.3.3	Ficorremediación a la intemperie.....	62
7.3.4	Comparación de la biomasa, contenido lipídico y ficorremediación lograda en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie	73
8	CONCLUSIÓN.....	77
9	REFERENCIAS.....	79
10	ANEXOS	85
10.1	Activación del inóculo	85
10.2	Conteo celular	86
10.3	Producción del inóculo.....	86
10.4	Producción escalada de biomasa.....	87
10.5	Producción de biomasa a mediana escala	88
10.6	Cosecha de la biomasa producida	89
10.7	Determinación de Nitrógeno Total Kjeldahl NKT (mg/L)	90
10.8	Técnica para determinar DQO	92
10.9	Técnica para determinación de sólidos	95
10.10	Humedad	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Instituto tecnológico de Boca del Río.	18
Figura 2. Estanque N°1 de cultivo de tilapia en sistema controlado en etapa de engorda. ...	24
Figura 3. Filtrado del efluente de tilapia a través de la columna.	24
Figura 4. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlamydomonas sp</i> en MMB. 26	
Figura 5. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlamydomonas sp</i> en Medio Basal Bold (MBB) y agua residual de tilapia estéril (ARTE) y agua residual de tilapia no estéril (ARTNE).	28
Figura 6. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en Medio Basal Bold (MBB) y agua residual de tilapia estéril (ARTE) y agua residual de tilapia no estéril (ARTNE).	29
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>Chlamydomonas sp</i> agua residual de tilapia estéril en sistema controlado vs intemperie.	30
Figura 8. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlamydomonas sp</i> en agua residual de tilapia no estéril en sistema controlado vs intemperie.	31
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia estéril en sistema controlado vs intemperie.	34
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia no estéril.	36
Figura 11. Efectos principales para la producción de biomasa	38
Figura 12. Interacción para la productividad de las cepas <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> con respecto al tipo de efluente aplicado	39
Figura 13. Efectos principales de lípidos en % de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	41
Figura 14. Comportamiento dinámico del amonio (NH_4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	44
Figura 15. Comportamiento dinámico del Amonio (NH_4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	44
Figura 16. Comportamiento dinámico del nitrito (NO_2) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	45
Figura 17. Comportamiento dinámico del nitrito (NO_2) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	45
Figura 18. Comportamiento dinámico del nitrato (NO_3) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	46
Figura 19 Comportamiento dinámico del nitrato (NO_3) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	46
Figura 20. Comportamiento dinámico del fosfato (PO_3^4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	47
Figura 21. Comportamiento dinámico del fosfato (PO_3^4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	48

Figura 22. Comportamiento dinámico de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	49
Figura 23. Comportamiento dinámico de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	50
Figura 24. Comportamiento dinámico del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i>	51
Figura 25. Comportamiento dinámico del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i>	51
Figura 26. Producción de biomasa de <i>Chlamydomonas spp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	55
Figura 27. Diagrama de Pareto para los lípidos % de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.	59
Figura 28. Producción de lípidos de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.....	60
Figura 29. Interacción de la producción de lípidos de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.	61
Figura 30. Concentración de amonio (NH ₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.	63
Figura 31. Concentración de amonio (NH ₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.	63
Figura 32. Concentración del nitrito en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.	65
Figura 33. Concentración de nitrito en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.	65
Figura 34. Concentración de nitrato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.	66
Figura 35. Concentración de nitrato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.....	67
Figura 36. Concentración de fosfato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.....	68
Figura 37. Concentración de fosfato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.	69
Figura 38. Comportamiento de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.	70
Figura 39. Comportamiento de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.....	70
Figura 40. Comportamiento del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlamydomonas sp</i> a la intemperie.....	71
Figura 41. Comportamiento del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con <i>Chlorella vulgaris</i> a la intemperie.	72
Figura 42. Activación de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	85
Figura 43. Incubación <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	85

Figura 44. Microalga <i>N. oculata</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	86
Figura 45. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	87
Figura 46. Cinética de crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i>	87
Figura 47. Incubación escalada en biorreactores de 20 L.....	88
Figura 48. Incubación escalada en biorreactores de 200 L.....	89
Figura 49. Cosecha y almacenamiento de la biomasa en recipientes de menor volumen. ...	89
Figura 50. Almacenamiento de la biomasa cosechada en recipientes de menor volumen ...	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de caracterización del agua residual	19
Tabla 2. Diseño experimental usado para evaluación de la producción de biomasa microalgal y lipídica.	20
Tabla 3. Caracterización del agua residual de tilapia del estanque N°1 del ITBOCA	25
Tabla 4. Comportamiento de la temperatura e iluminación en los fotobiorreactores implementando <i>Chlamydomonas sp</i> en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.....	31
Tabla 5. Comportamiento de la temperatura e iluminación en los fotobiorreactores implementando <i>Chlorella vulgaris</i> en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.....	36
Tabla 6. Porcentaje del contenido lipídico durante la fase exponencial y estacionaria del empleo de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en efluente de tilapia.....	42
Tabla 7. Promedio de eficiencia (η) de remoción total para ambas cepas de microalgas en el efluente residual de Tilapia estéril y no estéril.	53
Tabla 8. Producción y productividad de biomasa a la intemperie durante las fase exponencial y estacionaria del empleo de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en efluente de tilapia estéril y no estéril.....	57
Tabla 9. Porcentaje del contenido lipídico a la intemperie durante la fase exponencial y estacionaria del empleo de <i>Chlamydomonas sp</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en efluente de tilapia estéril y no estéril.	62
Tabla 10. Comparación de los promedios de eficiencia (η) de remoción total para ambas cepas de microalgas en el efluente residual de tilapia estéril y no estéril en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie.....	73
Tabla 11. Biomasa en base seca producida en condiciones de laboratorio y a la intemperie. Producción (mg mL^{-1}).....	75
Tabla 12. Comparación de lípidos en condiciones de laboratorio y a la intemperie. Producción (mg mL^{-1}).....	76

RESUMEN

El incremento de en la producción intensiva de tilapia lleva a la generación de grandes volúmenes de agua residual, la cual, no es apta para su reutilización o para descargarse en cuerpos de agua, debido a la alta concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos). Una alternativa para el tratamiento del agua residual de los cultivos intensivos de tilapia es a través de la ficorremediación por cultivos de microalgas, las cuales, aprovechan los nutrientes para el crecimiento, obteniendo biomasa de alto valor agregado. El objetivo de esta investigación fue producir biomasa microalgal en agua residual para disminuir los nutrientes y mejorar la calidad del agua residual de salida del cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*). El estudio se realizó en tres fases; la fase uno consistió recolección y pretratamiento por en caracterización fisicoquímica (amonio, nitritos, nitratos, fosfato, DQO y pH) y esterilización. En la fase dos, se evaluó el efecto de dos densidades celulares iniciales del inóculo (1×10^6 y 2.5×10^6 cel mL^{-1}) en las cinéticas de crecimiento en medio Basal Bold, agua residual estéril y no estéril de las cepas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris*, al igual que la evaluación del efecto de la temperatura en las cinéticas de crecimiento, la producción y productividad de biomasa, composición lipídica y ficorremediación. Por último, en la tercera fase, se realizó el cultivo de las cepas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en agua residual (estéril y no estéril) a intemperie, evaluando la productividad de biomasa microalgal, la composición lipídica y la ficorremediación. Durante la fase de crecimiento la mayor densidad celular se obtuvo al aplicar un inóculo inicial de 2.5×10^6 cel mL^{-1} : para la cepa *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* obteniendo densidad celular máxima de 1.88×10^7 y 9.44×10^6 cel mL^{-1} en fase exponencial respectivamente, obteniendo mayor crecimiento con *Chlorella vulgaris* en comparación con *Chlamydomonas sp*. En cuanto a la producción de biomasa la mayor producción 0.438 ± 0.025 mg mL^{-1} en el cultivo de la cepa *Chlamydomonas sp*, en agua residual no estéril durante la fase exponencial en condiciones de laboratorio. De acuerdo con el proceso de ficorremediación en agua residual (estéril y no estéril), se obtuvo remoción en los primeros 10 días, en el caso del DQO se alcanzó un porcentaje de remoción máximo de 22.13 % en agua residual no estéril, sin embargo, este parámetro se encontró fuera del límite permitido por la NOM-001-SEMARNAT-2021. Las

concentraciones de fosfato y pH en condiciones de laboratorio estuvieron dentro de los límites permisibles. En comparación con el experimento a la intemperie, la mayor producción de biomasa fue de $0.652 \pm 0.005 \text{ mg mL}^{-1}$ con *Chlamydomonas sp* en agua residual estéril y el mayor porcentaje de lípidos fue de $29.78 \pm 1.59 \%$ empleando *Chlorella vulgaris* en agua residual no estéril durante la fase exponencial. El cultivo de *Chlamydomonas sp* en agua residual estéril, logró una remoción del 45.97 % de DQO, sin embargo, este valor estuvo ligeramente por encima del límite máximo permitido por la NOM-001-SEMARNAT-2021, los resultados demuestran que es posible generar biomasa microalgal de *Chlamydomonas sp.* y *Chlorella vulgaris* en agua residual acuícola, disminuyendo los parámetros fisicoquímicos y mejorando la calidad del agua residual de un cultivo intensivo de tilapia.

ABSTRACT

One important environmental problem associated with tilapia production in semi-intensive and intensive production systems is the generation of large volumes of residual water. These residual waters are not suitable for reuse or discharge into bodies of water due to the high concentration of nitrogenous compounds (ammonium, nitrites, and nitrates). An alternative for the treatment of tilapia residual water is through phycoremediation using microalgae cultures, which take advantage of the nutrients present in them for growth, and biomass production. The goal of this research was to produce microalgal biomass in residual water of an intensive tilapia production system to reduce nutrients to permissible levels in the environmental regulation. The study was carried out in three phases; In phase one the residual water was characterized in terms of its physicochemical parameters (ammonium, nitrites, nitrates, phosphate, DOQ and pH). In phase two, the effect of two initial inoculums with cell densities of 1×10^6 and 2.5×10^6 cells/mL respectively, were evaluated for growth kinetics in Basal Bold medium, in sterile and non-sterile residual water, using *Chlamydomonas sp* and *Chlorella vulgaris* strains. The effect of temperature on growth kinetics, biomass production, productivity, lipid composition and phycoremediation was assessed. Finally, in the third phase, the *Chlamydomonas sp* and *Chlorella vulgaris* strains were cultured in residual water (sterile and non-sterile) outdoors, evaluating microalgal biomass productivity, lipid composition and phycoremediation. During the growth kinetics, the highest cell density was obtained by applying an initial inoculum of 2.5×10^6 cells/mL: for the strain *Chlamydomonas sp* and *Chlorella vulgaris* obtaining maximum cell density of 1.88×10^7 and 9.44×10^6 cells/mL in exponential phase respectively. A higher growth was obtained with *Chlorella vulgaris* compared to *Chlamydomonas sp*. Regarding biomass production, the highest production was 0.438 ± 0.025 mg mL⁻¹ in non-sterile residual water during the exponential phase for the *Chlamydomonas sp* strain, under laboratory conditions. The removal of parameters through the phycoremediation process of the residual water (sterile and non-sterile) was obtained in 10 days. In the case of DQO a maximum removal percentage of 22.13 % was reached in non-sterile residual water, however, this parameter exceeded the limit established in the standard NOM-001-SEMARNAT-2021. The reduction of phosphate and pH in laboratory conditions were within the permissible limit. The highest biomass production was $0.652 \pm$

0.005 mg mL⁻¹ with *Chlamydomonas sp* in sterile wastewater and the highest percentage of lipids was 29.78 ± 1.59 % using *Chlorella vulgaris* in non-sterile wastewater during the exponential phase. A 45.97 % DQO removal for *Chlamydomonas sp* in sterile wastewater was obtained, however, this value was slightly above the permissible limit established in the NOM-001-SEMARNAT-2021, the results show that it is possible to generate microalgal biomass of *Chlamydomonas sp.* and *Chlorella vulgaris* in aquaculture wastewater, decreasing the concentration of nutrients and improving the quality of wastewater from an intensive tilapia culture.

1 INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de tilapia en sistemas controlados representa cerca del 50 % del total de producción nacional (Carpio *et al.*, 2019), se prevé que este sector incremente en la próxima década (Pandit y Fulekar, 2019). Sin embargo, la cantidad de agua residual generada en las prácticas de producción intensiva de tilapia representa un problema ambiental debido a las altas concentraciones de compuestos nitrogenados como: amonio, nitritos y nitrato (Hasan *et al.*, 2021). Sin un adecuado tratamiento, estas aguas residuales, al ser descargadas en cuerpos de agua, provoca daños ambientales como la eutrofización (Ban *et al.*, 2018). Una alternativa para el tratamiento del agua residual acuícola es la biorremediación siendo una alternativa para tratar las aguas residuales de manera biológica, aplicando procesos biotecnológicos, tal es el caso del uso de microalgas como alternativa para el tratamiento de diversas aguas residuales, llevando a cabo la remoción de nutrientes como el nitrógeno y fósforo (Yang *et al.*, 2017). Las microalgas poseen un potencial para la generación de productos biotecnológicos, lípidos, proteínas, carbohidratos, así como bioenergías, ya que, a partir de los carbohidratos, se puede producir bioetanol; de los lípidos el biodiesel y de la biomasa residual el biogás (Carpio *et al.*, 2019). La generación de biomasa microalgal en agua residual acuícola genera una remoción de nutrientes permitiendo cumplir con el saneamiento del agua residual que permita su descarga a bienes nacionales o para su reutilización en el cultivo acuícola (Apandi *et al.*, 2018). *Chlorella vulgaris* es una microalga verde acuática, encontrada principalmente en cuerpos de agua soleados, con temperaturas de 29 a 37 °C y poco profundos, esta microalga puede convertir hasta el 20 % de energía solar en biomasa (Hasan *et al.*, 2021). Además, su eficiencia fotosintética aumenta el rendimiento proteico por unidad de área lo que permitiría obtener más grasas y vitaminas (Carpio *et al.*, 2019). *Clamydomonas sp* es resistente a temperatura ambiente en el trópico, con buenos rendimientos de biomasa y con un perfil de lípidos adecuado para la producción de biocombustibles (Andreotti *et al.*, 2020). La biomasa microalgal es considerada un producto de alto valor, por lo que indagar sobre su producción en agua residual acuícola representará una ventaja para los productores acuícolas, pues permitirá tratar el agua residual y obtener un subproducto de alto valor agregado (Pandit y Fulekar, 2019).

2 ANTECEDENTES

En la última década, la industria acuícola ha experimentado un notorio crecimiento que ha tenido un impacto significativo en la economía de diversas regiones. Según datos disponibles a partir del año 2021, se estima que la contribución de la acuicultura al Producto Interno Bruto (PIB) ha alcanzado alrededor del 19 %. Esta expansión subraya la importancia de este sector en términos de seguridad alimentaria y generación de empleo (Santo, 2021), en relación con el manejo del agua y sus implicaciones ambientales, se han registrado cifras relevantes en cuanto a descargas de agua residual acuícola de distintas etapas del proceso. En General durante la etapa de precría, se estima que se generan alrededor de 10 m³ de agua residual anualmente. A medida que los organismos acuáticos crecen, la cifra se incrementa considerablemente, llegando a aproximadamente 383 m³ de agua de crecimiento al año. En la etapa de engorda, se estima una generación de alrededor de 750 m³ de agua residual anual (Viegas *et al.*, 2021; Guardado, 2014).

Los efluentes de acuicultura tienen una elevada carga orgánica y altas concentraciones de nutrientes. o. se han reportado contaminantes presencia de nitrógeno amoniacal total, amoniaco, nitrato y demanda química de oxígeno. Estos efluentes provocan el crecimiento de algas causada por la sobrecarga de nutrientes. Estos a su vez, generan una disminución de oxígeno y turbiedad creciente (Viegas *et al.*, 2021). Para estos efluentes se han propuesto diversos tratamientos: 1) aplicación de bacterias de la especie *Bacillus* por ser altamente efectivos desnitrificantes en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Bindra y Kulshrestha., 2019); 2) sistemas de tratamientos a nivel de campo siendo efectivo para la remoción de N, P, DQO y solidos suspendidos totales (Guimarães, *et al.*, 2020); 3) construcción de humedales para la remoción de nutrientes presentes en el efluente, obteniendo resultados favorables al igual que los sistemas a nivel de campo; 4) biofiltros (Ansari *et al.*, 2019) y 5) acequias ecológicas (Andreotti *et al.*, 2020); 5) Se ha reportado el uso de efluentes de la industria acuícola como medios de cultivo de bajo costo para la generación de biomasa microalgal, esto con la finalidad de reducir costos (Guardado, 2014).

Las microalgas son ampliamente utilizadas como fuente de proteínas de bajo costo para la alimentación humana. Por su producción de lípidos, como fuentes de energía. También para

síntesis de bio-productos como obtención de sustancias químicas finas. Así como para la producción farmacéutica, bioconversión energética y su utilización para el tratamiento de aguas residuales (Arias *et al.*, 2013).

Las microalgas son utilizadas para la generación de bioenergías, tales como: a través de conversión química por fermentación: etanol, acetona, por digestión anaerobia: metano e hidrogeno, a través de conversión termoquímica por gasificación: gas combustible, por pirólisis: bioaceite, carbón, por licuefacción: bioaceite, a través reacción química por medio de transesterificación: biodiesel, y por ultimo a través de combustión directa por medio de generación de energía: electricidad (Sugumar *et al.*, 2020). No obstante, las implicaciones de la remoción de nutrientes y capacidad de acumulación de lípidos se desconocen cuando los microorganismos se cultivan en aguas residuales con respecto a otras que se cultivan en un medio de cultivo enriquecido.

2.1 Condiciones de cultivo

Pandit y Fulekar (2019) utilizaron un medio de cultivo enriquecido como el BG-11 conocido para el cultivo de cianobacterias, debido a su alta concentración de nitrato de sodio, además presenta sales de calcio, magnesio, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, borato y EDTA, además de utilizar como catalizador el óxido de calcio (CaO) utilizado de los desechos de huevos de gallina, esto como catalizador para la producción de biodiesel a partir de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Por otro lado, Bindra y Kulshrestha (2019) cultivaron inóculos a una temperatura controlada de laboratorio de 25 ± 1 °C en Medio Niebla, con un pH de 7.5, luz continua de 2000 Lux, para posteriormente llevar a cabo pruebas en medio hidrolizado de paja de arroz y aguas residuales de lechería en un volumen operacional de 1 L para evaluar el crecimiento de la microalga *Chlorella pyrenoidosa*, donde lograron producir aproximadamente 1 kg en peso seco de biomasa.

En el trabajo de Guimarães *et al.* (2020) emplearon la microalga *Spirulina sp.* LEB 18 a una temperatura de 30 ± 2 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con iluminación de 10 800 Lux, en medio sintético Zarrouk, para posteriormente llevar este inóculo con volumen inicial de 1 L a un biorreactor con efluente acuícola al aire libre con un volumen

operacional de 5 L y conocer su crecimiento y comportamiento a temperaturas de entre 30 ± 2 °C durante el otoño.

En el caso de Ansari *et al.*, (2019) emplearon un inóculo de la microalga *Scenedesmus obliquus* a una temperatura de entre 18-27 °C, en un estanque de 300 m³, con iluminación natural de 1822.5 lux, para conocer el tiempo y desarrollo de crecimiento de la microalga en el efluente acuícola como medio de cultivo y conocer una alternativa como esta agua de desecho podía ser utilizada para procesos de bioenergía. Carpio *et al.* (2019) cultivaron en un fotobiorreactor al aire libre, con temperaturas de entre 20-30 °C, con iluminación natural de 291360 lux durante el día empleando MBB con un volumen de 20 L y medio CHU con un volumen escalado de 250 L con las cepas de microalgas *Scenedesmus sp*, *Chlorella sp*, *Pediastrum sp* y *Haematococcus sp*.

1.1 Cinéticas de crecimiento

Ban *et al.* (2018) usaron las microalgas *Pseudomonas sp*, *Chlorella sp* y *Scenedesmus spp*, y documentaron la cooperación entre microalgas y bacterias mostrando una alta tasa de consumo de oxígeno, que elimina rápidamente la sensibilidad de las hidrogenasa de las microalgas al O₂. El contenido de clorofila, proteína y almidón de las células de las algas en la cooperación entre algas y bacterias se mantuvo en niveles altos. Se descubrió que una vía directa de fotólisis del medio TAP contribuye de manera más significativa a la mejora de la producción de H₂ que la vía indirecta basada en la degradación del almidón para la promoción de la producción de H₂ mediante la cooperación entre algas y bacterias.

Arumugan *et al.* (2020) emplearon *Nannochloropsis oceánica*, *Chlorella vulgaris*, *Neochloris conjunta* y *Nephroclamys subsolitaria*, a una temperatura de 25 ± 0.5 °C, intensidad de 1822.5 lux ciclo de luz/obscuridad (12: 12), en medio Conway (pre-inóculo) con un volumen inicial de 2 L, posteriormente emplearon un medio de cultivo de aguas de lodos de lagunas de tilapia y camarón con agua pura en un volumen total de 20 L, utilizada como solvente del lodo esterilizado proveniente de las lagunas, donde el rendimiento promedio de crecimiento fue de *Nannochloropsis oceánica*.

Gonçalves *et al.* (2020) emplearon como medio de cultivo agua residual proveniente de un estanque de lodos anaerobios de una planta de tratamiento de aguas residuales, con un pH

de entre 4.0-8.5, a una temperatura de temperatura 27 ± 2 °C, con un volumen inicial de 250 mL y de 1 L, para conocer los tiempos de sus fases de crecimiento y posteriormente llevar el inóculo a un volumen total de 20 mL, con las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus Sp.*

Andreotti *et al.*, (2020) emplearon la cepa de *Tetraselmis suecica* en medio de cultivo de agua residual de pez (*Sparus aurata*), con temperatura de 27 ± 0.2 °C, con un pH 8.2, en un periodo de 7-10 días de cultivo, con ciclos de luz obscuridad 12: 12 h, con un volumen inicial de 2 L para posteriormente ser llevado a un volumen total de 3.5 L.

2.2 Producción y productividad

Hasan *et al.* (2021) sugieren que el efluente del reactor anaeróbico híbrido diluido es eficaz para el cultivo de microalgas, donde la productividad máxima de la biomasa de microalgas es de 0.12 g/L/d^{-1} y la tasa de crecimiento es de 0,50 g el día. El co-cultivo de microalgas (*Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*) Cultivadas en fotobiorreactores usando luz solar natural mostró una remoción eficiente de nutrientes donde las eficiencias de remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ y PO_4^{3-} son 93 ± 1 % y 100 %, respectivamente. El polvo de semilla de *M. oleifera* fue una alternativa de alto potencial en comparación con el coagulante químico para la recolección de biomasa de microalgas con una eficiencia de recolección del 85 %. Además, el uso de luz solar natural y coagulantes naturales puede ayudar a reducir el costo de cultivo y recolección y ofrecer un enfoque ecológico para la producción de biomasa, que es sostenible para las energías renovables.

Wang *et al.* (2014) reportan en su investigación que la concentración de biomasa, el contenido de lípidos y la productividad de lípidos de *C. pyrenoidosa* cultivada con el medio F-Si son todos los más altos en comparación con otros medios tanto en interiores como en exteriores. Basándose en el medio F-Si, las concentraciones de nutrientes se optimizaron como: NaNO_3 500 mg L^{-1} , $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $7,7 \text{ mg L}^{-1}$ y $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6.30 mg L^{-1} . Cultivada con el medio optimizado, la concentración de biomasa, el contenido de lípidos y la productividad de lípidos de *C. pyrenoidosa* fueron significativamente mayores tanto en interiores como en exteriores. Debido a las enormes diferencias entre las condiciones

interiores y exteriores, el cribado medio y la optimización deben realizarse no solo en interiores sino también en exteriores para el cultivo de microalgas.

Sugumar *et al.*, (2020) emplearon la microalga *Dunaliella salina* aclimatada en medio enriquecido con nitrógeno, fósforo y potasio (18: 6: 18 m/m) por 3 g/L, en Medio Basal Bold, a una temperatura de 25 °C, en fotobiorreactores de columna y columna de burbuja con un pH 7.8, con iluminación continua con lámparas tubulares led, en un periodo de entre 10-14 días de cultivo en un volumen inicial de 250 mL, para posteriormente ser llevado a un volumen total de 5 L, rendimiento de lípidos del 80 % a partir de biomasa seca microalgal de un total de 60.22 g/L. Al igual que Rashial *et al.* (2019) emplearon las cepas de microalgas *Ettilla sp.* y *Chlorella sp* en un pre-inóculo de 50 mL en Medio Basal Bold, a una temperatura 25 ± 2 °C, con iluminación luz fluorescente de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, en biorreactores de columna tipo burbuja, mostrando un crecimiento hasta fase exponencial en los primeros 3-5 días, en un volumen inicial de 50 mL para posteriormente ser llevado a un volumen total de 1 L en efluente residual de tilapia, las microalgas mostraron una interacción simbiótica que logro una producción de biomasa de 3.23 ± 0.02 g/L, 2.08 ± 0.05 g/L en co-cultivo representando el 83 % de contenido lipídico y en monocultivo 2.72 ± 0.02 g/L y 2.54 g/L.

Torres *et al.* (2017) con la cepa de microalga *Nannochloropsis gaditina* en Medio de cultivo agua de mar enriquecida con fertilizantes, a una temperatura de 27 ± 1.2 °C, con iluminación con bombillas de 50 μmol , en ciclos de luz/obscuridad 12: 12 h, con un volumen total de 20 L obtuvieron un contenido lipídico después de la extracción de 64.98 ± 2.88 %. Después de 24 h de a 60 °C en incubadora nuevamente se obtuvieron 60.77 ± 0.88 %.

En el trabajo de Caporgno *et al.* (2015) emplearon como medio de cultivo agua residual proveniente de tanque de sedimentación de una planta de tratamiento de agua residual con las microalgas *Chlorella kessleri* & *Chlorella vulgaris*, y la especie marina *Nannochloropsis oculata*, a una temperatura de entre 27-30 °C, con ciclos de luz/obscuridad 12: 12 h, con un volumen inicial de 250 mL, posteriormente ser llevado a un volumen total de 1 L, el contenido de biomasa fue de 2.18 g/L, el contenido lipídico no estéril fue del 64.98 ± 2.88 %. En comparación con Morais *et al.* (2019), que emplearon la

microalga *Phaeodactylum tricornottum* en medio F/2 Guillard como inóculo inicial, a una temperatura de entre 18-20 °C, en un tiempo de cultivo 7-10 días, con luz continua intensidad de 8910 lux, en un volumen operacional de 40 mL, para posteriormente llevarlo a medio de cultivo agua de mar en un volumen total de 2 L y 250 L. La biomasa seca fue de 1.26 g/L, los medios mixotrofos produjeron mayor biomasa y lípidos de 18 mg L⁻¹*d, para esto agregaron glicerol como fuente de carbono, los experimentos iniciales produjeron 22 % más que los finales de mayor volumen, atribuyéndole a la luz continua como factor de aprovechamiento.

Thirug *et al.* (2020) emplearon como medio de cultivo agua de campos de arroz a la cepa de microalga *Chlorella vulgaris*, con un pH 8.5, con iluminación continua, a una temperatura de 25 ± 0.02 °C, en un volumen inicial de 100 mL, para posteriormente se llevado a un volumen total de 10 L. Estos eran medios de cultivos tratados para remover la presencia de otras algas verdes, obteniendo como resultado Biomasa seca 3.0 mg L⁻¹, contenido lipídico del 47.9 % de la biomasa seca.

En el trabajo de He *et al.*, (2020) se usaron *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis sp.* y *Nannochloropsis oceánica*, en el medio de cultivo modificado f/2 guillard, en una columna tipo burbuja de 1 L, con un pH 7.8, a una temperatura 23 ± 1 °C, con Luz led continua cilíndrica, con un inóculo inicial de 100 mL, posteriormente se llevó a una volumen total de 1 L y de 5 L, durante 14 días de cultivación, obteniendo como resultado biomasa seca de *Nannochloropsis oculata* de 4.28 g/L, *Nannochloropsis sp* de 3.76 g/L & *Nannochloropsis oceánica* de 4.06 g/L, con rendimiento de contenido lipídico del 81.42 %, 72.6 % y 80.12 %, respectivamente. En comparación con Almarashi *et al.* (2019) que emplearon *Chlorella vulgaris*, en medio de cultivo Flory, con un pH 7.5, a una temperatura 25 ± 1.3 °C, con ciclos de luz/obscuridad 16: 8 h, durante 20 días de producción, en un volumen inicial de 250 mL, para posteriormente llevarlo a un volumen total de 1 L, obteniendo una producción de biomasa de 0.193 g/L/d⁻¹ y de contenido lipídico de 18.7 a 23.3 %.

Wang *et al.*, (2014) emplearon *Chlorella pyrenoidosa*, en Medios de cultivo: MBB, Allen, BG-11, F-Si, SK y Walne, a una temperatura interior 25 °C, con una intensidad lumínica interior 8100 lux. Posteriormente se evaluó su producción al exterior a una temperatura 27

± 2 hasta 46 ± 2 °C, con una intensidad lumínica entre 5400 a 7560 lux descendiendo a 0 lux durante la noche. Se obtuvo mayor producción de biomasa en el medio F-Si, tanto en laboratorio como en exterior, en comparación con el resto de los medios. La biomasa máxima producida en laboratorio fue de 1.09 ± 0.013 g/L a las 96 h. La biomasa máxima producida al exterior fue de 1.3 ± 0.002 g/L a las 96 h. El contenido lipídico fue de 29.1 ± 0.981 %, y la productividad lipídica 73.3 ± 1.45 mg l⁻¹d⁻¹.

Kuwar *et al.*, (2021) emplearon *Scenedesmus sp (NC1)*, en medio de cultivo agua residual proveniente de una mina de carbón, con un pH 8, a una temperatura de 25 ± 2 °C, con ciclos de luz/obscuridad 12: 12 h, durante 17 días de producción, en un volumen inicial de 5 mL, para posteriormente llevarlo a volúmenes de 100 mL y de 2 L. Obtuvieron una biomasa máxima de 1.0 g/L/d⁻¹, y 66 % de rendimiento de contenido lipídico. En contraste Ranglová *et al.* (2020) emplearon *Chlorella vulgaris* en medios de cultivo BG-11 y aguas residuales municipales, con un pH 8.0 ± 0.2 , a una temperatura por las mañanas de entre 12 ± 0.10 a 20 ± 0.12 °C, Por las tardes de entre 23 ± 0.09 a 37 ± 0.10 °C, con una intensidad lumínica de 5400-91800 lux. Esto se llevó a cabo en 2 tinas para producción de biomasa, una tina con aireación y la otra en forma de cascada. Para reponer la pérdida de líquido por evaporación cada mañana adicionaban agua del grifo, obteniendo como resultado 3.1 g/L de biomasa en la tina con aireación y 2.4 g/L para la tina en forma de cascada.

En el estudio de Carneiro *et al.* 2020) emplearon la cepa de microalga *Nannochloropsis oceánica*, en el Medio de cultivo f/2 guillar con un pH: 8, a una temperatura durante el día 28 ± 1 °C, durante la noche 18 ± 1 °C. Se obtuvo biomasa seca, producida durante el día de 1.13 ± 0.07 gL⁻¹y durante la noche, de 1.07 ± 0.06 gL⁻¹.

Umamaheswari *et al.* (2019) emplearon *Scenedesmus obliquos*, en el medio de cultivo agua residual del proceso de remojo de arroz, en fotobiorreactores al aire libre sin aireación (PB), con aireación (PBR) y en un estanque abierto con agitación (RWP) a temperaturas durante el día de 27 ± 0.09 °C, y durante la noche de 23 ± 0.03 °C. ellos obtuvieron biomasa producida por fotobiorreactor PB: 1.02 ± 0.04 mg L⁻¹, PBR: 0.83 ± 0.002 mg L⁻¹ y RWP: 0.51 ± 0.003 mg L⁻¹.

En el trabajo de Feng *et al.* (2020) emplearon *Chlorella sp (GN1)*, en el medio de cultivo Blue Green (BG-11), en fotobiorreactores en forma de placa de distintos grosores (5 cm, 10

cm, 20 cm y 30 cm) a una temperatura ambiente de 25 ± 1 °C, a una intensidad lumínica de 13500 lux, obteniendo como resultado la biomasa cosechada con: NaNO_3 : 290 ± 5 mg /L*d, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: 345 ± 17 mg L⁻¹*d y NH_4Cl : 204 ± 8 mg L⁻¹*d y contenido lipídico (%) de 5 cm: $53.5 \pm 1.$, 10 cm: 49.7 ± 1.1 , 20 cm: 44.6 ± 2.1 y 30 cm: 38.6 ± 1.6 .

Ban *et al.*, (2017) emplearon las cepas de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* con las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* empleando como medio de cultivo agua del río Pearl, Wuhan, China., a una temperatura: 30 ± 2 °C, con intensidad lumínica de 2700 lux, con ciclos de luz/obscuridad: 12 h/12 h. Las adaptaciones de microalgas con bacterias, para obtener mejor rendimiento en la producción de H₂. En comparación con He *et al.* (2016) quienes emplearon las cepas de microalgas *Chlorella sp*, *Chlorella sorokiniana*, *Monoraphidium dybowskii* (Y2), *Monoraphidium bybowskii* (XJ-151) y *Scenedesmus spp* utilizando como pre-cultivo el Medio BG-11, para posteriormente llevarlo al exterior: Medio BG-11 con remplazo del NaNO_3 por Urea (0.25 g/L), durante un periodo de evaluación verano-otoño, mayo-octubre, con periodos de sombreado de 11: 30 am a 14: 30 pm, durante un periodo de 15 días de evaluación. En exterior, la cepa *Scenedesmus spp* se deterioró y en la producción de biomasa se registró la presencia de amebas, ciliados y rotíferos. La mayor producción de biomasa se obtuvo con *Chlorella sp*: 1.09g/L, (14.54 g/m²d). El mayor contenido lipídico (%): *M. dybowskii* (Y2): 32.76 *M. dybowskii* (XJ-151): 29.80, y la mayor productividad lipídica fue con *Chlorella sp*: 3.76 g/m²d y *M. dybowskii* (Y2): 3.67 g/m²d.

Yang *et al.*, 2019) emplearon las cepas de microalgas *Chlorella vulgaris*, *Aspergillus spp*, en el medio de cultivo artificial para preservar *Chlorella vulgaris*, a 30 °C y en agar dextrosa y papa para preservar *Aspergillus spp* a 30 °C, y posteriormente tomar un inóculo del cultivo para *Chlorella vulgaris* y *Aspergillus spp* en aguas residuales de melaza pretratadas como medio de cultivo. Obtuvieron una producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*: 1.851 g/L y de *Aspergillus spp*: 3.465 g/L en co-cultivo de *Chlorella vulgaris*-*Aspergillus spp*: 35.2 %.

1.2 Fitorremediación

Yang *et al.* (2019) mencionan que las aguas residuales de melaza ricas en materia orgánica con un alto contenido de sólidos en suspensión no pueden ser tratadas de manera eficiente por un monosistema de microalgas, por lo tanto, han propuesto un co-cultivo de microalgas con hongos, incrementando el rendimiento de biomasa, la decoloración y la remoción de nutrientes ($DQO_i = 11,230 \text{ mg L}^{-1}$, $DQO_f = 3328 \text{ mg L}^{-1}$, $NT_i = 407.5 \text{ mg L}^{-1}$, $NT_f = 130.5 \text{ mg L}^{-1}$, $NH_3-N_i = 170.3 \text{ mg L}^{-1}$, $NH_3-N_f = 9.2 \text{ mg L}^{-1}$, $FT_i = 30.4 \text{ mg L}^{-1}$, $FT_f = 3.1 \text{ mg L}^{-1}$). La biomasa de microalgas y hongos presentaron bajos porcentajes de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) el cual podría ser aplicada en la producción de biodiesel.

Guimarães *et al.* (2020), utilizaron un medio de cultivo sintético para evaluar los rendimientos de remoción de la cepa *Spirulina sp.* (LEB 18), con la finalidad de ser aplicada en agua residual acuícola, obtuvieron una remoción de Fosfato del 99,97 %, DQO de 89,34 % y Nitrato del 81,10 %. También evaluaron el perfil lipídico obteniendo altas concentraciones de ácidos grasos 16: 0 (palmítico) y C18: 3n3 (Omega-3).

Zhu *et al.* (2019) cultivaron la cepa *Chlorella sp* en un medio sintético Bristol modificado, removiendo el nitrógeno entre un 70.4 y 74.1 % y logrando una producción de biodiesel del 10 % (8.5-11.2 g de biodiesel/100 g de peso seco). En comparación con Medina *et al.* (2019) que cultivaron la cepa *Chlorella sp* en un sistema Raceway en medio de cultivo MBB y obtuvieron una producción de biomasa de 0.82 g/L.

Hasan *et al.* (2021) realizaron un co-cultivo con las cepas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp* en agua residual doméstica, en condiciones ambientales con iluminación solar natural de 12 horas (7: 00 a 19: 00) y una intensidad lumínica de $5724 \pm 1080 \text{ lux}$ por la mañana, $5940 \pm 1566 \text{ lux}$ a mediodía y $756 \pm 162 \text{ lux}$ por la tarde, a una temperatura de $35 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Obtuvieron una productividad de 0.12 g/L/d^{-1} , un rango de pH entre 8 y 8.1, disminuyendo la turbidez de 461 a 11 NTU, el Nitrato de 1.6 a 0.2 mg L^{-1} , el Nitrato de 0.05 a 0.01 mg L^{-1} , Amoniacó de 31.64 a 25.5 mg L^{-1} , la DQO de 270 a 20 mg L^{-1} y Fósforo de 9.23 a 6.8 mg L^{-1} .

Tejido *et al.* (2019) cultivaron las cepas *Chlorella vulgaris* y *Tetradismus obliquus* en agua residual de tilapia de un sistema de recirculación, a una temperatura $24 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, con iluminación continua de 13500 lux, con un pH de 7.5. Durante 13 y 18 días, con la cepa *Chlorella vulgaris* redujeron 16.1 mg L^{-1} de Fosfato, 38.4 mg L^{-1} de DQO, 152.8 mg L^{-1} de

Nitrato, con la cepa *Tetradismus obliquus* redujeron 0.31 mg L⁻¹ de Nitrato (99.8 %) y 0.05 mg L⁻¹ de Fosfato.

Gao *et al.* (2016) emplearon las cepas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, en agua residual de acuicultura, con un volumen operación de 4 a 5 L, alimentado por CO₂ (pureza de 99.9 %) y una intensidad lumínica de 9000 lux, con aireación continua, a una temperatura de 25 °C. Con la cepa *Chlorella vulgaris* se produjo un 7.3 mg L⁻¹*d de biomasa y 6.2 mg L⁻¹ con la cepa *S. obliquus*. Por otro lado, se redujo 4.28 ± 0.38 mg L⁻¹ de Nitrógeno amoniacal, 0.92 a 0.13 ± 0.07 mg L⁻¹ de Nitrito, 14.28 mg L⁻¹ a 2.00 ± 0.23 mg L⁻¹ de Nitrato, 6.81 ± 0.68 mg L⁻¹ de Nitrógeno total, 2.42 a 0.42 ± 0.05 de Fosfato y 8.5 ± 1.9 mg L⁻¹ de DQO.

Tejido *et al.* (2020) emplearon las cepas *Chlorella vulgaris* (CCAP211/52) y *Tetradismus obliquus* (SAG 276-1) en agua residual de un sistema de recirculación acuícola, a escala de laboratorio con un volumen operacional 100 mL en monocultivos y co-cultivo, en agua residual estéril y no estéril, a una temperatura 25 °C, en una atmosfera de 2 % de CO₂, con iluminación continua de 4860 lux y con agitación de 115 rpm (revoluciones por minuto). A escala piloto, el reactor presentó una superficie inclinada de 18 m², en monocultivos, en agua residual estéril y no estéril, con sensores medidores de espesor (8 mm), presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono, pH, temperatura, volumen de agua y agua añadida, turbidez, y una inyección de CO₂ durante el día. A continuación, se describe la cantidad de biomasa obtenida en los diferentes tratamientos; *T. obliquus* de manera estéril: 7.52 ± 0.11 y de manera no estéril: 6.38 ± 0.67, con *Chlorella vulgaris* de manera estéril: 5.09 ± 0.08 y manera no estéril: 4.40 ± 0.32 y en co-cultivo: estéril: 6.17 ± 0.06 y de manera no estéril: 6.12 ± 0.07 y con una productividad de co-cultivo en el piloto escala: 13.3 g/m²/d⁻¹. También, se obtuvieron remociones a nivel de laboratorio: nitrato (mg L⁻¹) i: 47.8 - f: 0.82 (98 %) y el Fosfato (mg L⁻¹) i: 8.8 mg L⁻¹ - f: 0.005 (99 %) y de manera a escala piloto: Nitrato (mg L⁻¹) i: 2.39 - f: 0.32 y el Fosfato (mg L⁻¹) i: 0.213 - f: 0.005 mg L⁻¹.

Petraglia *et al.* (2018) emplearon la cepa de microalga *Amphora sp* en agua residual de camarón estéril, con un volumen total de 6 L, a una temperatura de 25 ± 1 °C, con una iluminación: 8100 lux por 12 h, con aireación continua a presión atmosférica, se obtuvieron

resultados de remoción de Nitrato_i (mg L⁻¹): 1.81- Nitrato_f: 0.497, de Nitrito_i (mg L⁻¹): 0.003 mg L⁻¹ - Nitrito_f: 0.002 y de Fosfato_i (mg L⁻¹): 0.29 - Fosfato_f: 0.077.

Gou *et al.* (2013) emplearon la cepa *Platymonas subcordiformis* en agua residual acuícola, en fotobiorreactores de 300 mL y 500 mL, con agitación 4 veces al día, a una temperatura de 25 °C, con iluminación fluorescente a una intensidad lumínica de 2700 lux, con ciclos luz/oscuridad: 14 h/10 h. Se lograron remoción de Amonio (mg L⁻¹)_i: 0.529, Nitrito (mg L⁻¹)_i: 0.164, Nitrato (mg L⁻¹)_i: 1.697, Fosfato (mg L⁻¹)_i: 8.87, Amonio (mg L⁻¹)_f: 0.12, Nitrito (mg L⁻¹)_f: 0.04, Nitrato (mg L⁻¹)_f: 0.35 y Fosfato (mg L⁻¹)_f: 0.05.

En la investigación de Halfhide *et al.* (2014) emplearon las cepas *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp* y un consorcio mixto de especies nativas, fueron cultivadas en agua residual acuícola, en un biorreactor con un volumen de 300 mL, en condiciones axénicas y no axénicas, con iluminación continua 8278.2 ± 1015.2 lux, a una temperatura: 25 °C, con un filtro de aireación continua e inyección del 1 % de CO₂, con concentraciones de DQO_i: de manera axénica: 238 mg L⁻¹, de manera no axénica: 253 mg L⁻¹. Se lograron remociones DQO: de manera axénica: 178.5 mg L⁻¹ y de manera no axénica: 64.77-0.76 mg L⁻¹, para el nitrato_i: de manera axénica: 17.6 mg L⁻¹ y de manera no axénica: 18.1 mg L⁻¹. Con *Chlorella sp* de manera axénica: Nitrato_f: 0.33 ± 0.05 mg L⁻¹ y de manera no axénica: Nitrato_f: 0.67 ± 0.05 mg L⁻¹, y con *Scenedesmus sp* de manera axénica: Nitrato_f: 0.23 ± 0.1 mg L⁻¹ y de manera no axénica: Nitrato_f: 0.18 ± 0.4 mg L⁻¹, y con el consorcio mixto de especies nativas de manera axénica: Nitrato_f: 0.11 ± 0.14 mg L⁻¹ y de manera no axénica: Nitrato_f: 0.65 ± 0.02 mg L⁻¹.

Viegas *et al.* (2021) emplearon las cepas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis salina* y *Spirulina major*, en agua residual acuícola. Se realizaron de 3 set de experimentos; Set 1 crecimiento por lote, a una temperatura de 26 ± 1 °C, con un volumen inicial de 700 mL; Set 2; crecimiento semicontinuo con transferencia periódica de 75 mL de agua residual no estéril, a una temperatura de 15 ± 1 °C, con mayor crecimiento algal: *Chlorella vulgaris* & *Scenedesmus obliquus* en un volumen inicial de 1.5 L; Set 3; crecimiento semicontinuo con transferencia periódica de 150 mL de agua residual no estéril, con aireación continua, una iluminación continua de 6750 lux, con ciclos de luz/oscuridad 12/12. El primer set de experimentos realizados se

llevó a cabo para observar el mejor rendimiento en términos de remoción y producción de biomasa microalgal en efluente acuícola. *Chlorella vulgaris* & *Scenedesmus obliquus* fueron seleccionadas ya que a los 22 días obtuvieron el mejor rendimiento en productividad de biomasa y remoción de nutrientes, en cambio, el resto de las microalgas logro este rendimiento a los 33 días, obteniendo resultados de remoción: en el set 1: Nitrógeno: $168.3 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$ Nitrógeno: 0 mg L^{-1} , Fósforo: $32.9 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ Fósforo: 0 mg L^{-1} , DQO_i: $1.95 \pm 0.18 \text{ g/L}$, con *Chlorella vulgaris* el DQO: $0.26 \pm 0.06 \text{ g/L}$, con *Scenedesmus obliquus* la DQO: $0.18 \pm 0.03 \text{ g/L}$, con *Isochrysis galbana* DQO: $0.31 \pm 0.00 \text{ g/L}$, con *Nannochloropsis salina* DQO: $0.55 \pm 0.09 \text{ g/L}$, con *Spirulina major* DQO: $0.12 \pm 0.08 \text{ g/L}$. En set número 2 y 3; Nitrógeno: $737.8 \pm 4.7 \text{ mg L}^{-1}$, Fósforo: $22.1 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1}$ y la DQO_i: $5.20 \pm 0.14 \text{ g/L}$, lograron con *Chlorella vulgaris* Nitrógeno: 0 mg L^{-1} , Fósforo: 0 mg L^{-1} y la DQO_i: $0.32 \pm 0.03 \text{ g/L}$, con *Scenedesmus obliquus* el Nitrógeno: 0 mg L^{-1} , Fósforo: $0.15 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$ y la DQO_i: $0.31 \pm 0.02 \text{ g/L}$.

Hende *et al.* (2014) emplearon un floculo bacteriano de microalgas en el medio de cultivo efluente acuícola, con aireación continua suplementada con CO₂, en condiciones laboratorio a una temperatura: 25 °C, con una iluminación continua, en reactores por lote en secuencia con un volumen inicial de 4 L. Posteriormente se preparó un inóculo inicial de 40 L, en un tiempo de operación 69-97 días. Se empleó este inóculo en 400 L, en un tiempo de operación de 98 días, en una temperatura de entre 14-23°C sin calefacción, a la intemperie: con aireación continua suplementada con CO₂, en un volumen total de 12 m³. Por 231 días, a una temperatura de 12 °C con un sistema de calefacción, filtro de 1.2 mm para remover materia como único pretratamiento al efluente, se empleó un sistema de calefacción para la operación del reactor a la intemperie, el reactor a la intemperie se agito con una bomba de hélice de forma discontinua para evitar acumular lodos mientras se desechaba el exceso de afluente. Se obtuvieron resultados de una producción de biomasa (mg L⁻¹): en condiciones de laboratorio (40 L): 131 ± 16 , (400 L): 59.5 ± 76 , y a la intemperie (12m³): 96 ± 337 , con una productividad de biomasa (mg L⁻¹ *d): Condiciones de laboratorio (40 L): 65 ± 8 , (400 L): 15 ± 19 , y a la intemperie (12 m³): 23 ± 54 , las concentraciones (mg L⁻¹) iniciales de DQO_i: 110 ± 8.8 y de Fosfato_i: 2.66 ± 0.26 , logrando remociones de únicamente para la DQO: en condiciones de Laboratorio (40 L): 88 ± 26 ($80 \pm 10 \%$), en (400 L): 80.5 ± 13.5 ($58.5 \pm 29 \%$), a la intemperie (12 m³): 4 ± 7 ($28 \pm 48 \%$)

y para las remociones del Fosfato_r: en el laboratorio (40 L): 1.73 ± 0.73 (65 ± 15 %), (400 L): 1.38 ± 0.68 (64.5 ± 12.5 %), y a la intemperie (12 m³): 0.29 ± 0.31 (64 ± 22 %).

3 JUSTIFICACIÓN

En México, la intensificación de la acuicultura tiene como consecuencia un aumento en el volumen de las descargas sin previo tratamiento. Estas descargas contienen altas concentraciones de compuestos nitrogenados, fósforo, carbono orgánico disuelto, amonios, nitratos y nitritos, y no son aptas para su reutilización en los mismos cultivos acuícolas o para ser descargados a cuerpos de aguas nacionales. El aprovechamiento de estos efluentes como medio de cultivo para microalgas puede tener potencial para generar productos biotecnológicos en la industria alimenticia, salud y medicina humana, alimentación animal, compuestos orgánicos o como fuente de materia prima para la producción de biocombustibles. Lo anterior, debido a que muchas de ellas son ricas en aceite, tienen alta eficiencia fotosintética, se multiplican rápido y requieren una mínima extensión superficial para su cultivo, comparada con los cultivos agrícolas. Además, el aprovechamiento de estos nutrientes en exceso en los efluentes acuícolas por las microalgas aporta una solución en el saneamiento de aguas para su reutilización en la acuicultura o para su descarga a cuerpos de agua. Por otra parte, la biomasa microalgal puede tener rendimientos lipídicos que hagan posible la obtención de bioenergía empleando efluentes de acuicultura intensiva y así mejorar la eficiencia energética del sistema de producción acuícola, hacer un mejor uso de agua y dar un tratamiento adecuado a los efluentes. La remoción de nutrientes presentes en el agua residual acuícola es necesaria pues estos nutrientes pues en el medio favorecen una disminución de oxígeno, generan una turbiedad creciente y otros cambios en la calidad del agua que afecta a los ecosistemas acuáticos. Mediante el desarrollo de esta investigación se pretende avanzar el conocimiento respecto al uso de microalgas para la remediación evaluando un sistema controlado y a la intemperie.

4 HIPÓTESIS GENERAL

Es posible generar biomasa microalgal de *Clamydomonas sp.* y *Chlorella vulgaris* cultivada a la intemperie empleando agua residual acuícola y mejorar la calidad del efluente de un cultivo intensivo de tilapia, cumpliendo con la normatividad aplicable en materia de descargas de aguas acuícolas a cuerpos de aguas nacionales (NOM-001-SEMARNAT-2021).

4.1 HIPÓTESIS ESPECÍFICA

Se obtendrá biomasa microalgal de *Clamydomonas sp.* y *Chlorella vulgaris* en medio de cultivo no estéril al aumentar el tamaño del inóculo

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar las condiciones de operación para la producción de biomasa microalgal en un reactor operado a la intemperie.

5.2 Objetivo específico

- Caracterizar fisicoquímicamente el efluente a emplear como medio de cultivo para la microalga *Clamydomonas sp.* y *Chlorella vulgaris*.
- Identificar el tamaño del inóculo efectivo para la producción de biomasa empleando efluentes acuícolas en un sistema de cultivo microalgal estéril y a la intemperie.
- Determinar la producción y productividad de biomasa y lípidos.
- Analizar la ficorremediación en el efluente acuícola en términos de los establecido por la NOM-001-SEMARNAT-2021 en un sistema de cultivo microalgal estéril y no estéril a la intemperie.

6 METODOLOGÍA

6.1 Fase 1. Caracterización del agua residual

6.1.1 Muestreo

Se caracterizó el efluente acuícola en el Instituto tecnológico de Boca del Río (Figura 1), del estanque número 3 del cultivo de tilapia ubicado en el municipio de Boca del Río, Veracruz, México (19.09, -96.10). Se recolectaron 100 L de agua residual del cultivo de tilapia en recipientes de plástico de 20 L, limpios y secos, el muestreo se realizó en el punto de salida del estanque, se dejó transcurrir 1 min el flujo de salida del efluente, posteriormente se realizaron tres enjugues al recipiente recolector con el agua residual de tilapia con la finalidad de un muestreo uniforme, evitando el llenado del recipiente para evitar la inhibición de microorganismos nativos. Se consideró la norma oficial mexicana NMX-AA-003-SCFI-2019 para la conservación del agua residual, posterior se realizó un filtrado a través de una columna empacada compuesta con malla para fitoplancton de 100 μm , algodón y fibra de poliéster (guata) con la finalidad de remover la materia orgánica y posteriormente se preservó en refrigeración a temperatura de 4 °C con ausencia de luz.

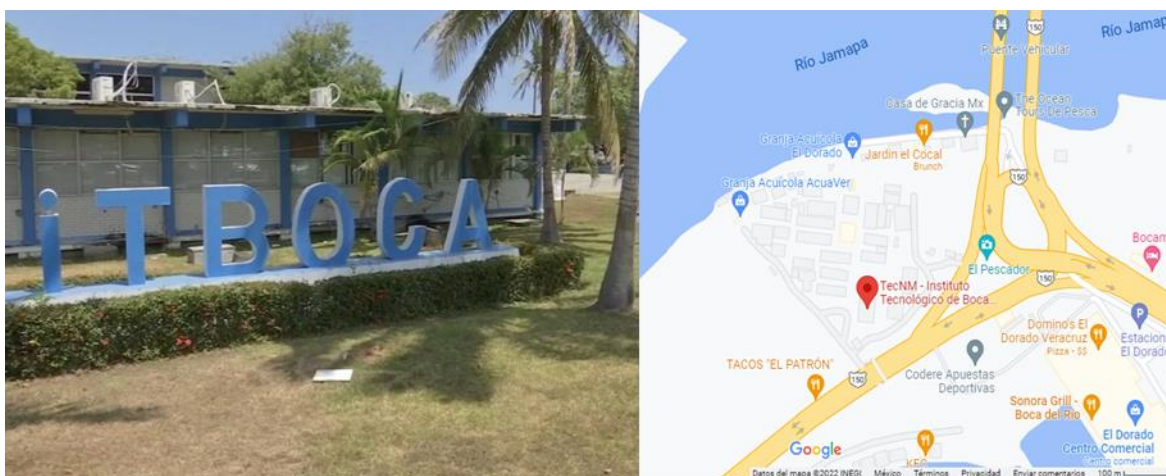


Figura 1. Instituto tecnológico de Boca del Río.

6.1.2 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica del efluente se realizó empleando el equipo multiparamétrico marca HANNA (Modelo HI83099), los parámetros analizados fueron Amonio, Nitritos, Nitratos, Fosfato, Demanda Química de Oxígeno (DQO) y pH, de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021 (Tabla 1), el procedimiento de cada determinación se encuentra en el anexo A.

Tabla 1. Parámetros de caracterización del agua residual

Parámetro (mg L ⁻¹)	Método	Límite permisible*
Amonio	Hanna Instruments	
Nitritos	Hanna Instruments	
Nitratos	Hanna Instruments	
Fosfato	Hanna Instruments	15
DQO	Hanna Instruments	150
pH	Hanna Instruments	6-9

*Nota: NOM-001-SEMARNAT-2021

6.2 Fase 2. Evaluación de las condiciones de operación

En este estudio se emplearon, dos cepas de microalgas, *Chlamydomonas sp* cepa aislada de la región de Tierra Blanca, proporcionada por el Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca y *Chlorella vulgaris* CLV2 del Departamento de Acuicultura del centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) proporcionada por el Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz. Las cuales, fueron activadas en medio sintético Bold Basal de manera controlada durante 19 días, mediante conteo celular diario.

Para la esterilización del agua residual acuícola, se agregó 1 ml de cloro por cada litro de agua residual con aireación constante durante 24 horas, pasado el periodo de cloración, al agua se le agregó 0.5 g de tiosulfato de sodio por cada mililitro de cloro, durante dos horas sin suspender la aireación.

La composición de los medios residuales se dividió en dos tipos: el primero contenían 50 mL de agua residual estéril y el segundo 50 mL de agua residual no estéril, inoculadas con 1×10^6 cel mL⁻¹ de *Chlamydomonas sp* o *Chlorella vulgaris* del medio sintético, en matraces de 150 mL, las condiciones de crecimiento fueron luz continua y 2800 luxes, ciclos de

luz/obscuridad 12 h/12 h, temperatura 25 °C y aireación continua, por 19 días, para identificar la fase exponencial y estacionaria, posteriormente se realizó el escalamiento a 500 mL, 1 L y 2 L a nivel laboratorio (Vonshak y Maske, 1982; Ferrer *et al.*, 2015).

6.2.1 Diseño de experimental

Se evaluaron los factores: tipo de microalga (*Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris*) y el tipo de sustrato (efluente de tilapia no estéril y estéril) utilizando un diseño experimental factorial de 2x2 (Tabla 2). Cada tratamiento se realizó por triplicado por lo que serán un total de 12 unidades experimentales.

Tabla 2. Diseño experimental usado para evaluación de la producción de biomasa microalgal y lipídica.

Factores	Niveles
Tipo de microalga	<i>Chlamydomonas sp</i>
	<i>Chlorella vulgaris</i>
Tipo de sustrato	Efluente de Tilapia no estéril
	Efluente de Tilapia Estéril

Las variables de respuesta: Producción de biomasa microalgal, rendimiento de biomasa microalgal, composición lipídica y ficorremediación.

La evaluación de la tasa de crecimiento se realizó mediante la siguiente ecuación

Ecuación 1

$$\mu = \frac{\frac{dx}{dt} * 1}{x}$$

Donde:

μ: tasa de crecimiento

X: concentración biomasa $\left(\frac{cél}{mL}\right)$

t: tiempo en días (d)

El tamaño del inoculo se determinó por medio de conteo celular, con la cámara de Neubauer (Pica-granados *et al.*, 2004) utilizando la ecuación:

Ecuación 2

$$V2 = \frac{C1 * V1}{C2}$$

Donde:

V1= Volumen de operación en el reactor (mL)

C1= Densidad celular inicial en el reactor (cel mL⁻¹)

V2= Volumen de inóculo requerido para el reactor (mL)

C2=Densidad celular del inóculo en el momento de realizar la inoculación al reactor (cel mL⁻¹)

Para la determinación de biomasa en la fase exponencial y estacionaria, la biomasa se filtró a través de una membrana (papel filtro) a peso constante, el peso seco de la biomasa microalgal en mg se calculó con la ecuación:

Ecuación 3

$$BH (g L^{-1}) = \frac{pmbh - pms}{400 ml}$$

$$BS (g L^{-1}) = \frac{pmbs - pms}{400ml}$$

BS=Base seca

Pmm= Peso de membrana seca

Pms= Peso de membrana con muestra seca

La caracterización del efluente se realizó desde el día 0, posteriormente cada tercer día durante quince días, para ello se tomaron muestras de 60 mL y retirando toda la biomasa microalgal. La eficiencia de remoción estuvo en relación con el aprovechamiento de los nutrientes en exceso causantes de contaminación de este efluente por las microalgas como fuente de alimento, la cual se calculó con la siguiente ecuación:

Ecuación 4

$$\eta_i = ((X_i - X_f) / X_f) * 100$$

Dónde:

η_i : eficiencia de remoción del sistema, o de uno de sus componentes [%]

X_i : Nutrientes de entrada (DQO mg L⁻¹, Amonio, Nitratos y Nitritos)

X_f: Nutrientes de salida (DQO mg L⁻¹, Amonio, Nitratos y Nitritos)

6.2.2 Extracción de lípidos

Se determino el rendimiento lipídico a cada tratamiento. Para la determinación de lípidos, primero se realizó la extracción de lípidos de la biomasa microalgal previamente seca empleando una mezcla de cloro/metanol (1: 2 v/v) por el método de Soxhlet (Halim *et al*, 2011). Para realizar la extracción (Anexo B) fue necesario tener a peso constante el matraz de extracción, se registró el peso seco, posterior a esto se ensambló el equipo completo de extracción y se adicione el solvente al matraz. La muestra se extrajo después de 5 reflujos del sistema, y el solvente se eliminó por evaporación bajo campana de extracción. Posterior a esto se colocó el matraz en el desecador y el peso se registró.

La cantidad de lípidos extraídos se calculó con la siguiente:

Ecuación 5

$$\text{Grasacruda}(\%) = \frac{m2 - m1}{m} * 100$$

Donde:

m= Peso de la muestra

m1=tara del matraz a peso constante

m2= peso del matraz con lípidos

6.3 Fase 3. Implementación del modelo a la intemperie.

Se realizó la producción microalgal con *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en el efluente de tilapia no estéril y estéril, para la evaluación de la producción de biomasa (Ecuación 3), fitorremediación (Ecuación 4) y composición lipídica (Ecuación 5), en condiciones a la intemperie con ciclos de iluminación natural de aproximadamente 11 horas al día en promedio de 6753.38 ± 2214.17 lux y con un promedio de temperatura de entre 28.96 ± 1.57 °C durante el día a nivel intemperie, en fotobiorreactores de 2 L, y aireación continua, por 19 días.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Fase 1. Caracterización del agua residual

El muestreo del agua residual de tilapia del estanque número 1 de reproducción de tilapia del Instituto Tecnológico de Boca del Rio (Figura 2), la cual fue filtrada debido a que el agua presento alta concentración de materia orgánica la cual, puede afectar el crecimiento de las microalgas (Figura 3).



Figura 2. Estanque N°1 de cultivo de tilapia en sistema controlado en etapa de engorda.



Figura 3. Filtrado del efluente de tilapia a través de la columna.

En la Tabla 3 se observan los valores obtenidos de las concentraciones de Amonio, Nitrito, Nitrate, Fosfato, DQO y pH del efluente acuícola. De acuerdo con la norma NOM-001-SEMARNAT-2022, los valores del agua residual estéril y no estéril se encuentran dentro de los límites permisibles de contaminantes establecidos, sin embargo, el valor de la DQO está fuera de lo establecido por la norma. De acuerdo con algunas investigaciones realizadas en efluentes acuícolas Hasan *et al.* (2021), obtuvieron compuestos nitrogenados: 31.64, 0.05 y 1.6 mg L⁻¹ de amonio, nitrito y nitrato, al igual que una concentración 9.23 mg L⁻¹ de Fosfato y DQO de 270 mg L⁻¹, en comparación con este trabajo los parámetros fueron altos en el agua residual estéril.

Tejido *et al.* (2019) en agua residual de tilapia sin ningún tratamiento, menciona que la composición de Nitrato, Fosfato y DQO fueron de 152.8, 16.1 y 38.4 mg L⁻¹ respectivamente, estos resultados al ser comparados con los de este trabajo fueron altos de

acuerdo con la Tabla 3, sin embargo, los autores mencionan que el agua residual de tilapia es de tres recirculaciones del sistema de crianza. De igual forma en comparación con Gao *et al.*, (2016) declaró 0.92, 14.28 y 2.42 mg L⁻¹ de Nitrito, Nitrato y Fosfato respectivamente en su trabajo, siendo resultados mayores en comparación con el de este trabajo (Tabla 3). Los autores mencionan que el agua residual de tilapia fue en empleada muestreada durante la temporada de verano lo que afecta en la mayoría de los parámetros debido a la evaporación de los sistemas de cultivo.

Por otro lado, Carrillo (2019) determinaron Amonio, Nitrato y Nitrito en agua acuícola con resultados de 1.7, 34 y 0.13 mg L⁻¹ respectivamente, comparables con los obtenidos en este estudio (Tabla 3) y mencionan que al agua residual se le puede aplicar microalgas como *Chlorella* para lograr una disminución de los parámetros contaminantes evitando la eutrofización de las zonas de descarga, sin embargo mencionan que los cultivos microalgales en aguas residuales acuícolas el comportamiento del crecimiento está afectado por con la temperatura, para las microalgas de agua dulce a intemperie es recomendable que se encuentre entre los 25 hasta 35 °C (Acién *et al.* 2013; Hernández & Labbé 2014). Asimismo, las microalgas en un cultivo para ficorremediación deben cumplir con condiciones de tasa de crecimiento: tolerancia a la variación estacional y diurna, para la obtención de componentes de alto valor agregado como los lípidos para la generación de biodiesel, en la industria o alimentación (Raouf *et al.*, 2012).

Tabla 3. Caracterización del agua residual de tilapia del estanque N°1 del ITBOCA

Parámetro (mg L ⁻¹)	<i>Agua residual no estéril</i>	<i>Agua residual estéril</i>	<i>Limite permisible*</i>
Amonio	1.24 ± 0.0070	0.093 ± 0.0141	
Nitrito	0.14 ± 0.0070	0.22 ± 0.0070	
Nitrato	0.01 ± 0.0015	1.05 ± 0.3535	
Fosfato	1.42 ± 0.1060	0.38 ± 0.3535	15
DQO	279.27 ± 20.4205	358.33 ± 17.0977	150
pH	7.32 ± 0.1802	6.86 ± 0.1857	6-9

*NOM-001-SEMARNAT-2021

7.2 Fase 2. Evaluar las condiciones de operación

7.2.1 Análisis del crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas sp*

En la figura 4, se observa las cinéticas de crecimiento en MBB para las cepas *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas sp* obteniendo una densidad celular de 3.05×10^7 cel mL⁻¹ en el día doce y en el día catorce una densidad celular de 4.63×10^7 cel mL⁻¹ con *Chlorella vulgaris* durante la fase exponencial y estacionaria respectivamente. La cepa *Chlamydomonas sp* se obtuvo una densidad celular de 3.81×10^7 cel mL⁻¹ en el día once y en el día catorce de 5.69×10^7 cel mL⁻¹.

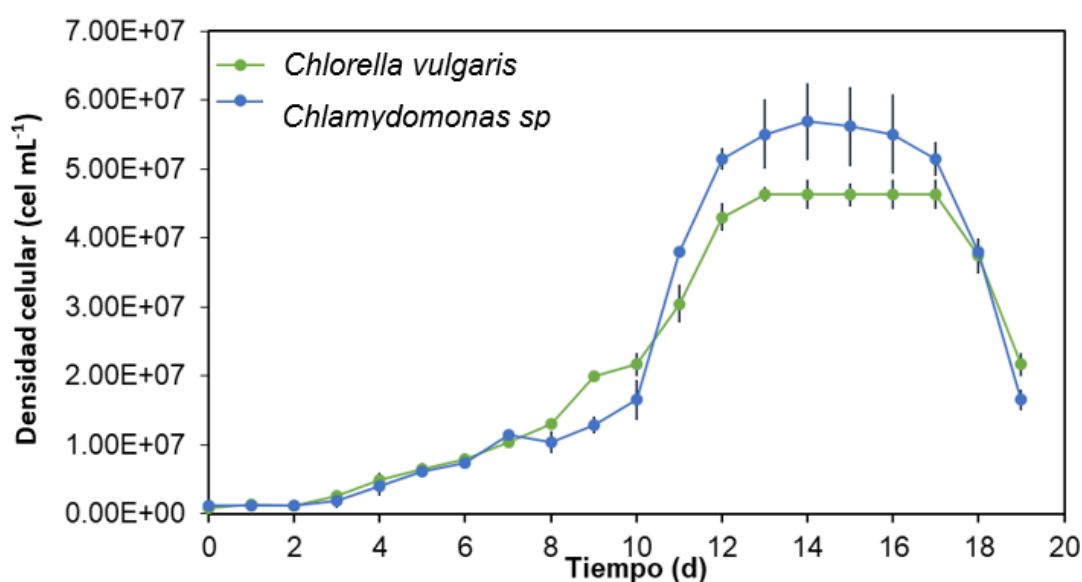


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas sp* en MMB.

De acuerdo con el análisis de la cinética de crecimiento de ambas cepas de microalgas en agua residual de tilapia estéril (ARTE) con un inoculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹, se observó que la densidad celular obtenida fue menor en comparación con la cinética de crecimiento en medio MBB, como se muestra en la Figura 5.

En contraste, los cultivos en agua residual de tilapia no estéril (ARTNE) con el mismo inoculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹ mostraron un período de crecimiento corto y resultaron en la muerte de las microalgas en los primeros días. Ante esta situación, se realizaron nuevas cinéticas de crecimiento incrementando el inoculo inicial a 2.5×10^6 cel mL⁻¹ utilizando agua residual no estéril. Como resultado, se logró una mayor densidad celular para ambas

cepas de microalgas en comparación con el inoculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹. Además, se observó que el comportamiento de crecimiento fue similar al obtenido en ARTE de la cinética de crecimiento, lo que confirmó que al aumentar el inoculo es posible prolongar los periodos de crecimiento sin la necesidad de esterilizar el efluente. Este comportamiento se asemejó al del medio de cultivo control en MBB.

Indicando que el uso de agua residual no estéril con un inoculo inicial adecuado puede ser una estrategia viable para mejorar la densidad celular y prolongar los períodos de crecimiento de las microalgas, evitando la necesidad de esterilización y, por ende, reduciendo los costos asociados al tratamiento del efluente. Estos resultados son valiosos en el contexto de aplicaciones biotecnológicas y en la búsqueda de alternativas sostenibles para el cultivo de microalgas en aguas residuales.

La cinética de crecimiento de *Chlamydomonas sp* se evaluó en dos medios de cultivo: agua residual de tilapia estéril (ARTE) y agua residual de tilapia no estéril (ARTNE), utilizando un inoculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹. En el cultivo con ARTE, se observó una fase exponencial en el octavo día con una densidad celular de 1.09×10^6 cel mL⁻¹, seguida de una fase estacionaria a partir del undécimo día con una densidad celular de 1.27×10^7 cel mL⁻¹ (Figura 5). En contraste, en el cultivo con ARTNE, se alcanzó una densidad celular máxima de 1.86×10^7 cel mL⁻¹ en el tercer día, de acuerdo con la cinética de crecimiento.

Al aumentar el inoculo inicial a 2.5×10^6 cel mL⁻¹ en el cultivo con ARTNE, se observaron densidades celulares de 7.77×10^6 cel mL⁻¹ y 9.64×10^6 cel mL⁻¹ para el séptimo y décimo día, respectivamente, durante las fases exponencial y estacionaria. Estos resultados indican que el medio de cultivo ARTNE favorece un mayor crecimiento celular en comparación con ARTE, y que un aumento en el inoculo inicial también influye positivamente en la densidad celular durante el crecimiento de *Chlamydomonas sp*. Estos hallazgos son relevantes para entender la dinámica de crecimiento de esta microalga en distintas condiciones de cultivo y pueden tener implicaciones en aplicaciones biotecnológicas y ambientales.

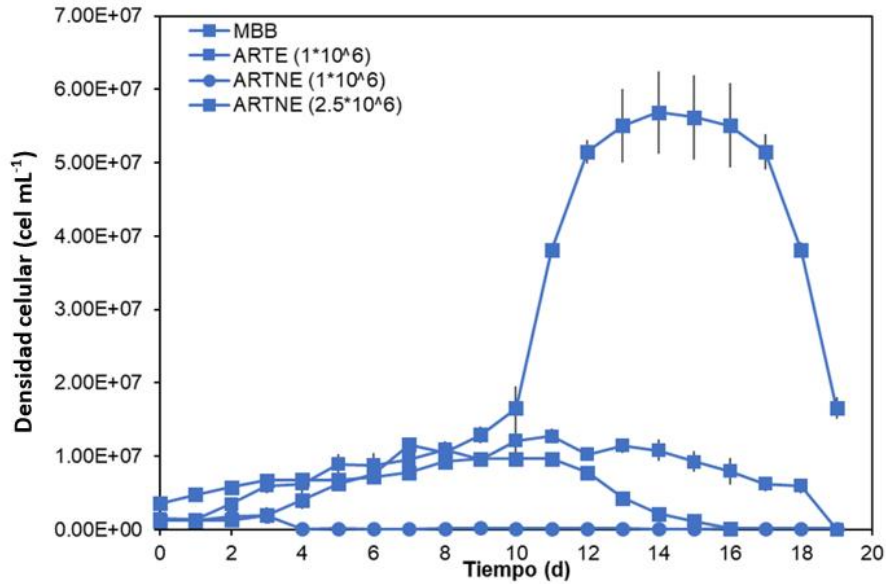


Figura 5. Cinéticas de crecimiento de *Chlamydomonas sp* en Medio Basal Bold (MBB) y agua residual de tilapia estéril (ARTE) y agua residual de tilapia no estéril (ARTNE).

En la Figura 6 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes condiciones de cultivo utilizando agua residual de tilapia. En el cultivo con agua residual de tilapia estéril (ARTE) y un inóculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹, se observó un aumento progresivo en la densidad celular. La fase exponencial se alcanzó en el octavo día, logrando una densidad celular de 1.33×10^7 cel mL⁻¹, mientras que, en la fase estacionaria, que se presentó a partir del decimotercer día, la densidad celular alcanzó 1.61×10^7 cel mL⁻¹.

En el caso del cultivo con agua residual de tilapia no estéril (ARTNE) y un inóculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹, se obtuvo una densidad celular máxima de 7.44×10^6 cel mL⁻¹ en el octavo día. Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento adicionales en ARTNE, incrementando el inóculo inicial a 2.5×10^6 cel mL⁻¹. Como resultado, se observaron densidades celulares máximas de 7.77×10^6 cel mL⁻¹ en el séptimo día y 9.64×10^6 cel mL⁻¹ en el décimo día, durante las fases exponencial y estacionaria, respectivamente.

Los resultados muestran que el medio estéril (ARTE) favoreció un mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en comparación con el medio no estéril (ARTNE) con el mismo inóculo inicial. Sin embargo, al aumentar el inóculo inicial en ARTNE, se lograron densidades celulares más altas, acercándose a los niveles observados en el medio estéril. Por lo tanto,

las condiciones de cultivo, incluyendo la esterilidad del medio y el inoculo inicial, ejercen un impacto significativo en la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Estos hallazgos son relevantes para la optimización del cultivo de microalgas en aguas residuales.

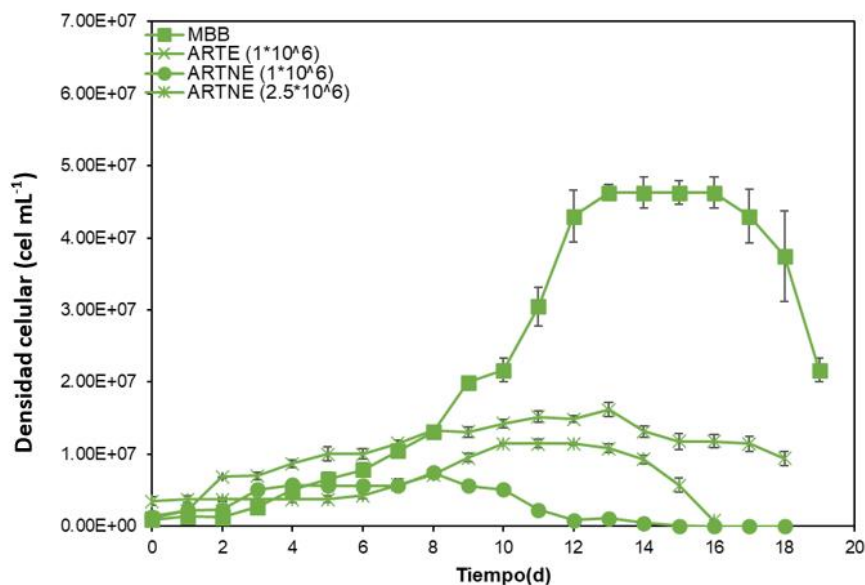


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en Medio Basal Bold (MBB) y agua residual de tilapia estéril (ARTE) y agua residual de tilapia no estéril (ARTNE).

7.2.2 Determinación del efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento de *Chlamydomonas sp* controlado y a la intemperie

En la Figura 8 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento de *Chlamydomonas sp* en agua residual de tilapia estéril bajo condiciones controladas de laboratorio. Durante la fase exponencial, específicamente en el día 8, se logró una densidad celular máxima de 1.09×10^7 cel mL⁻¹, mientras que, en la fase estacionaria, se alcanzó una densidad celular máxima de 1.27×10^7 cel mL⁻¹ en el undécimo día. En contraste, el cultivo realizado a intemperie con un inoculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹, mostró resultados mayores. Durante la fase exponencial, se obtuvo una densidad celular máxima de 2.69×10^7 cel mL⁻¹ en el séptimo día, y durante la fase estacionaria, la densidad celular alcanzó su máximo valor de 3.35×10^7 cel mL⁻¹ en el noveno día.

Es importante señalar que este cultivo a intemperie se llevó a cabo a una temperatura promedio de 29 ± 1.5 °C y con una iluminación solar natural promedio de 6812.24 ± 2331.8 lux durante el día (Tabla 4), a lo largo de los 16 días de operación. indicando que las

condiciones ambientales a intemperie favorecieron un mayor crecimiento de *Chlamydomonas sp* en comparación con las condiciones controladas de laboratorio. La disponibilidad de luz solar natural y una temperatura adecuada pueden haber sido factores determinantes en el aumento de la densidad celular observada en el cultivo a intemperie. De acuerdo con Cabello *et al.*, 2015, los cultivos de microalgas la densidad celular de los cultivos se ve afectada, al aumento de la temperatura debido a que la fotosíntesis se incrementa con el aumento de intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación de luz, por lo cual es de suma importancia la aplicación de condiciones específicas para cada especie (Hernández & Labbé 2014).

Por lo tanto, el crecimiento de *Chlamydomonas sp* en agua residual de tilapia estéril fue influenciado por las condiciones de cultivo, con un rendimiento notablemente mayor bajo condiciones a intemperie. Estos hallazgos pueden ser relevantes para el desarrollo de estrategias de cultivo de microalgas en entornos exteriores y pueden tener aplicaciones prácticas en la biotecnología y la gestión de aguas residuales.

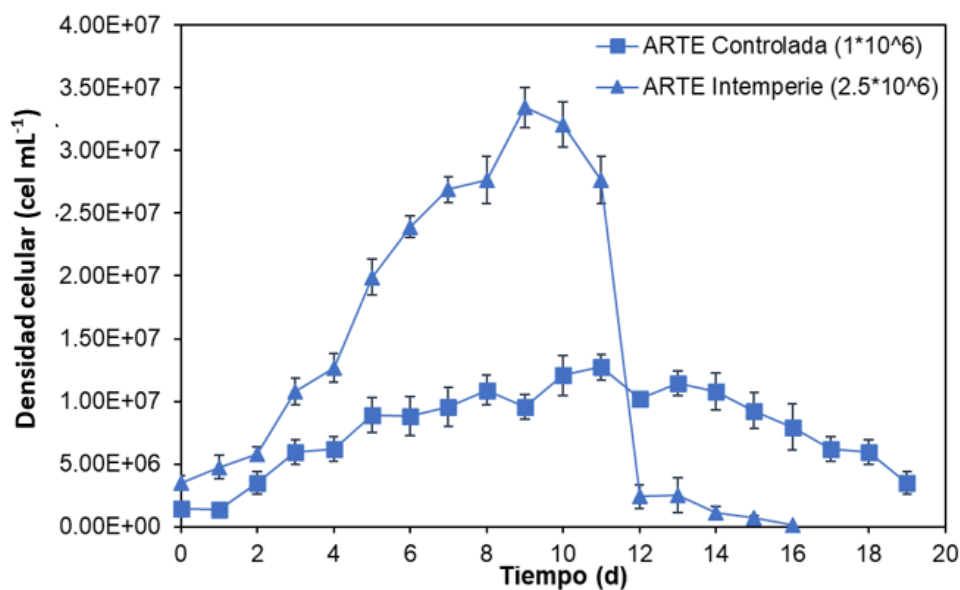


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Chlamydomonas sp* agua residual de tilapia estéril en sistema controlado vs intemperie.

En la Figura 8 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa *Chlamydomonas sp* en agua residual de tilapia no estéril. La densidad celular máxima se presentó en el día tres con una

con un valor de 1.86×10^7 cel mL⁻¹ y la fase de lisis celular ocurrió en el cuarto día. Por otro lado, se puede observar la cinética de crecimiento con un inoculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹, durante la fase exponencial se obtuvo una densidad celular máxima en el séptimo día, de 7.77×10^7 cel mL⁻¹ y durante la fase estacionaria se obtuvo una densidad celular máxima en el décimo día de 9.64×10^6 cel mL⁻¹.

El cultivo a la intemperie con un inoculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹ demostró una mayor densidad celular en la fase exponencial y estacionaria en el séptimo día con 1.88×10^7 cel/mL⁻¹ y 2.30×10^7 cel mL⁻¹ en el décimo día respectivamente, a una temperatura promedio de 29 ± 1.6 °C, con iluminación solar natural de 6812.24 ± 2331.8 Lux durante el día (Tabla 4) durante el periodo de operación de 16 días. De acuerdo con los resultados, se puede observar un incremento en la densidad celular con el inoculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹ en relación con el inoculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹.

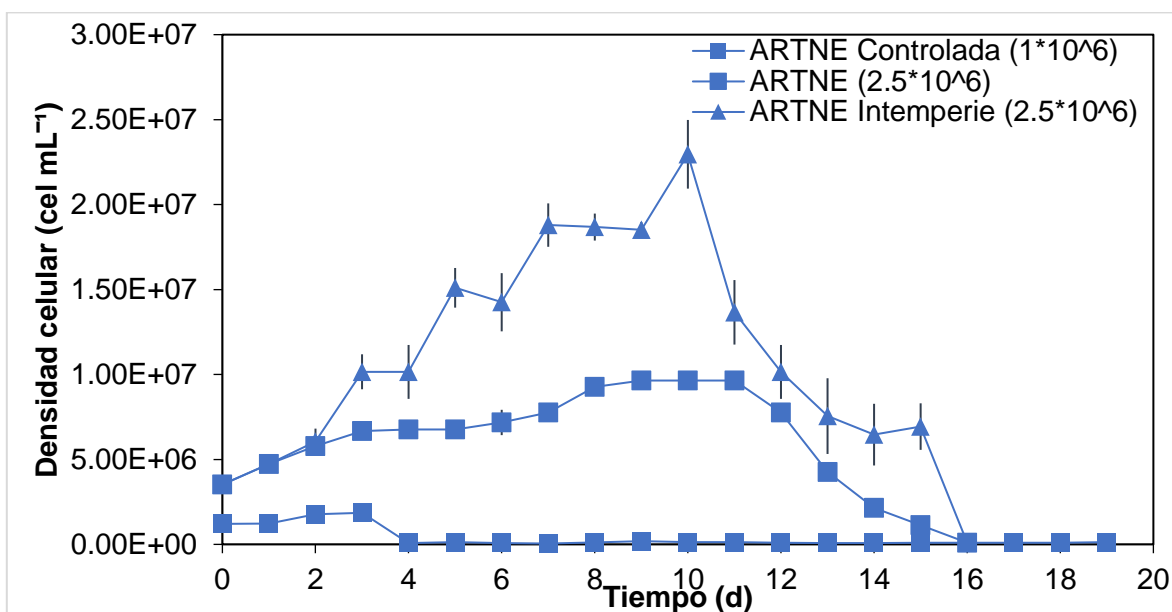


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *Chlamydomonas sp* en agua residual de tilapia no estéril en sistema controlado vs intemperie.

Tabla 4. Comportamiento de la temperatura e iluminación en los fotobiorreactores implementando *Chlamydomonas sp* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.

Periodo (día)	lx	Promedio (lx)	T °C	Promedio (T °C)
Mañana	6384.66 ± 2658.78		27 ± 1.4243	
Tarde	9099.33 ± 2820.70	6812.24 ± 2331.82	29.81 ± 1.8025	29 ± 1.5978
Noche	4954.87 ± 1515.99		31 ± 1.5683	

7.2.3 Determinación del efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* controlada y a la intemperie

En la Figura 9 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril. Durante el seguimiento, se observó que la densidad celular máxima en las fases exponencial y estacionaria ocurrió en el undécimo día, alcanzando valores de 1.52×10^7 cel mL⁻¹ y 1.61×10^7 cel mL⁻¹ en el decimotercer día, respectivamente. Por otro lado, se realizó un cultivo a la intemperie utilizando un inóculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹. En este caso, se obtuvieron valores notables de densidad celular máxima durante la fase exponencial y estacionaria, que ocurrieron en el décimo día con 3.93×10^7 cel mL⁻¹ y en el doceavo día con 4.97×10^7 cel mL⁻¹, respectivamente.

El cultivo a la intemperie se llevó a cabo a una temperatura promedio de 28.92 ± 1.5 °C, con iluminación solar natural promedio de 6694.53 ± 2096.5 lux durante el día (Tabla 5), a lo largo del periodo de observación. Los resultados resaltan que el cultivo a la intemperie favoreció un incremento significativo en la densidad celular de *Chlorella vulgaris*, en comparación con el cultivo en agua residual de tilapia estéril. La disponibilidad de luz solar natural y la temperatura adecuada pueden haber sido factores determinantes en el aumento de la densidad celular observado en el cultivo a la intemperie. En general, el cultivo de *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y a la intemperie presentó diferentes patrones de crecimiento celular. El cultivo a la intemperie mostró una mayor densidad celular, lo que sugiere que las condiciones ambientales pueden influir significativamente en el crecimiento de esta microalga. La temperatura alta afecta la actividad fotosintética provocando la desnaturalización de los fotosistemas (Cabello *et al.*, 2015) por lo tanto las microalgas comienzan a morir, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de intensidad lumínica, hasta alcanzar la tasa máxima de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación de luz (Hernández & Labbé, 2014). Las microalgas en un cultivo para biorremediación deben cumplir condiciones de tasa de crecimiento, tolerancia a la variación estacional y diurna (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

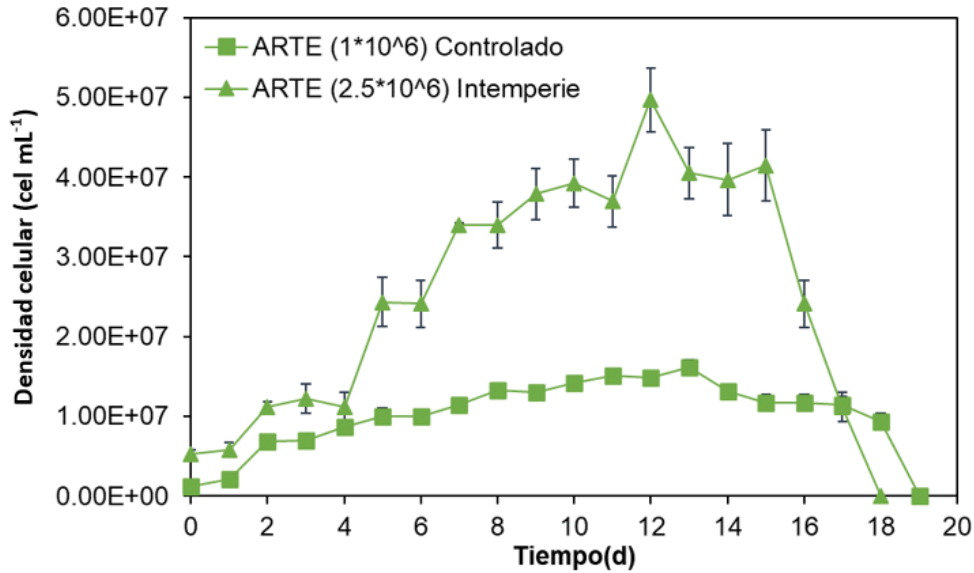


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril en sistema controlado vs intemperie.

En la Figura 10 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia no estéril, tanto en condiciones controladas de laboratorio como a la intemperie, utilizando dos inóculos iniciales diferentes. En condiciones controladas de laboratorio, con un inóculo inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹, se observó que la mayor densidad celular ocurrió durante la fase exponencial y estacionaria en el sexto día, alcanzando valores de 5.65×10^6 cel mL⁻¹ y 7.44×10^6 cel mL⁻¹ en el octavo día, respectivamente.

Por otro lado, con un inóculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹ en condiciones controladas, la cinética de crecimiento mostró que la mayor densidad celular ocurrió en la fase exponencial y estacionaria en el noveno día, con valores de 9.49×10^6 cel mL⁻¹ y 1.15×10^7 cel mL⁻¹ en el undécimo día, respectivamente. El cultivo a intemperie, también utilizando un inóculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹, alcanzó la mayor densidad celular en la fase exponencial y estacionaria en el tercer día, con valores de 9.44×10^6 cel mL⁻¹ y 1.34×10^7 cel mL⁻¹ en el quinto día, respectivamente. Sin embargo, se observó una fase de muerte del cultivo al día siguiente (sexto día).

Es importante mencionar que el cultivo a intemperie se llevó a cabo a una temperatura promedio de 28.92 ± 1.5 °C, con iluminación solar natural promedio de 6694.53 ± 2096.5 lux durante el día (Tabla 5), a lo largo del periodo de estudio.

Los resultados indican que las condiciones ambientales a intemperie tuvieron un impacto significativo en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, resultando en una mayor densidad celular durante las fases exponencial y estacionaria en comparación con el cultivo en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, también se observó una fase de muerte del cultivo a intemperie, lo que sugiere que las condiciones externas pueden influir en la viabilidad y la duración del crecimiento de esta microalga, los datos obtenidos resaltan la importancia de considerar las condiciones ambientales en el cultivo de *Chlorella vulgaris* en aguas residual.

En el estudio realizado por Ferrer et al. (2015), se llevó a cabo una evaluación de la producción microalgal en fotobiorreactores con el propósito de obtener biocombustibles y llevar a cabo la ficorremediación de efluentes acuícolas. Para ello, se utilizaron dos cepas de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Nanochloropsis oculata*, en un periodo de cultivo de 10 días, manteniendo una temperatura de 20 °C y una intensidad lumínica de $74.07 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Por otro lado, Ferrer et al. (2015), se observó que la densidad celular obtenida en nuestro estudio fue más alta que la reportada en su investigación. Además, en otro estudio realizado por López et al. (2019), se obtuvo una densidad celular más baja que la que obtuvimos en esta investigación. Por lo que las condiciones específicas del cultivo, como el periodo de cultivo, la temperatura y la intensidad lumínica, pueden influir significativamente en la densidad celular alcanzada por las microalgas. Asimismo, las características intrínsecas de las cepas utilizadas también pueden contribuir a las diferencias en los resultados entre estudios.

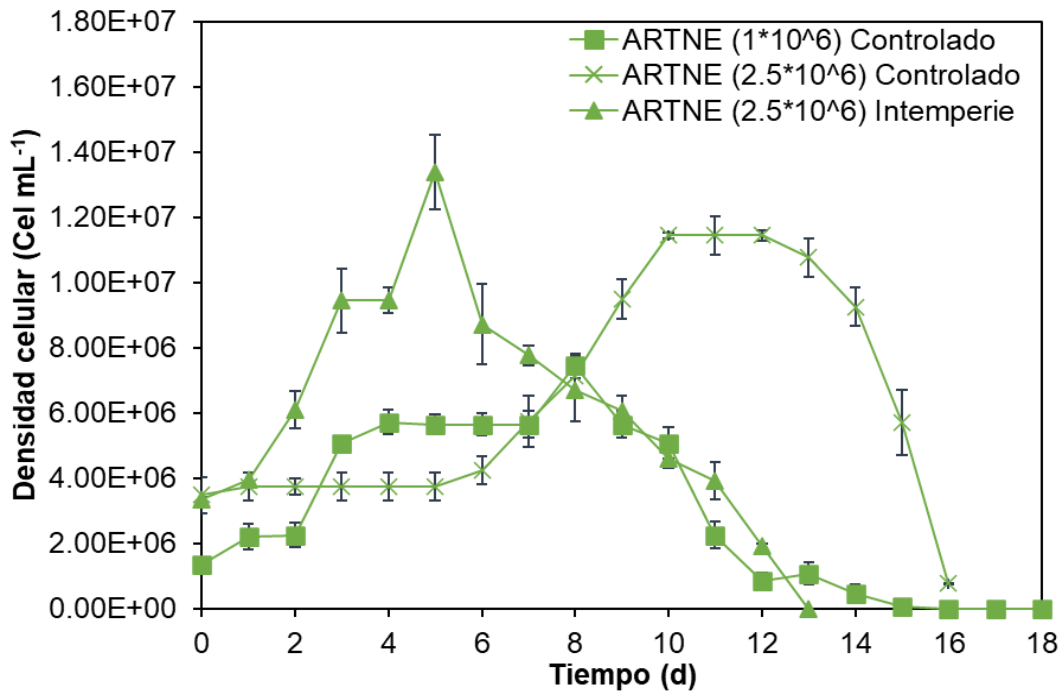


Figura 10. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia no estéril.

Tabla 5. Comportamiento de la temperatura e iluminación en los fotobiorreactores implementando *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie

Periodo del día	lx	Promedio (lx)	T °C	Promedio(°C)
Mañana	8330.66 ± 25470.41	6694.53 ± 2096.52	26.67 ± 1.7421	28.92 ± 1.5593
Tarde	7090.66 ± 2493.41		30.32 ± 0.7748	
Noche	4661.33 ± 1318.49		29.76 ± 2.1609	

7.2.4 Determinación de la producción y productividad de biomasa cultivada controlada y a la intemperie

De acuerdo con el análisis estadístico con una r-cuadrada del 86.96 % la mayor producción de biomasa se obtiene empleando la microalga *Chlorella vulgaris* en fase estacionaria con una producción de 0.165 mg mL^{-1} en comparación con *Chlamydomonas sp* (Figura 11). En el trabajo de Gao *et al.* (2016) reportaron una productividad de 7.3 mg L^{-1} de biomasa con *Chlorella vulgaris* y 6.2 mg L^{-1} de biomasa con *Scenedesmus obliquus* empleando como medio de cultivo efluente residual de tilapia, aireación continua y alimentado con CO_2 (pureza de 99.9 %), una intensidad lumínica de 9000 Lx durante los 10 días de operación y a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, la productividad por lo reportado en esta investigación es mayor, lo cual, pudo deberse a la implementación del CO_2 .

De acuerdo con diversas investigaciones que han abordado la producción de biomasa microalgal utilizando aguas residuales acuícolas y otros efluentes, se recomienda considerar cuidadosamente la implementación de un pretratamiento antiséptico en el agua residual. Si bien se ha observado que este pretratamiento puede resultar en una mejora en la producción y/o productividad de las microalgas, es importante tener en cuenta que también puede incrementar los costos de operación. Por tanto, se sugiere realizar un análisis de costos-beneficios detallado para evaluar la viabilidad económica de la implementación del pretratamiento antiséptico. Es posible que en algunos casos los beneficios en términos de mayor producción de biomasa no compensen los costos adicionales. En lugar de descartar el aprovechamiento de las aguas residuales como medio de cultivo, se recomienda considerar alternativas que permitan reducir los costos de cultivo. Como se ha observado en investigaciones previas, el uso de aguas residuales como medio de cultivo puede ser favorable y resultar en una disminución de los costos de producción de biomasa de alto valor agregado.

Por otro lado, en comparación con el tipo de efluente aplicado *Chlorella vulgaris* muestra una mayor producción de biomasa empleando efluente de tilapia no estéril con una producción de 0.153 mg mL^{-1} de biomasa en comparación con *Chlamydomonas sp* y el medio estéril (Figura 11). De acuerdo con investigaciones enfocadas en la producción de biomasa microalgal empleando aguas residuales acuícolas; así como aquellas enfocadas en el tratamiento de efluentes residuales, los valores obtenidos en esta investigación están por

debajo de los valores obtenidos en producción de microalgas por Ansari (2017), el cual, obtuvo 1.15 mg mL^{-1} con cultivos por lote en su fase exponencial empleando agua de descarga de invernaderos como fuente de nutrientes, haciendo hincapié que no siempre la mayor concentración de nutrientes conlleva a la obtención de una máxima producción de biomasa.

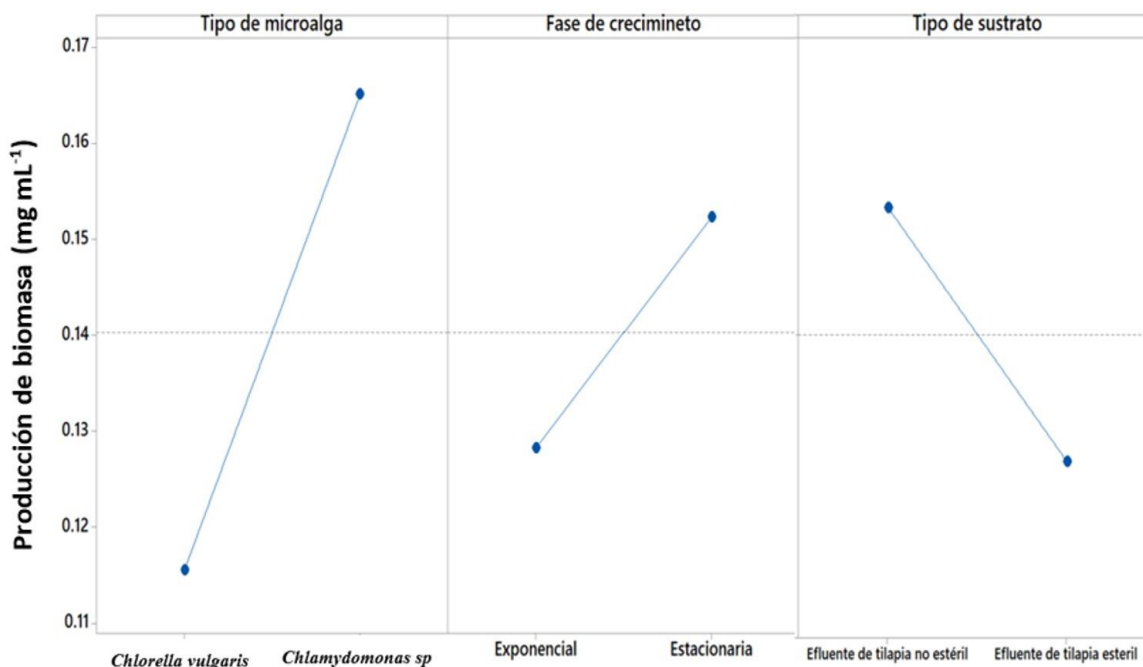


Figura 11. Efectos principales para la producción de biomasa

En la gráfica de interacción para la productividad de las cepas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* con respecto al tipo de efluente aplicado (Figura 12), se observa que la máxima producción de biomasa fue de 0.1438 y $0.1201 \text{ mg mL}^{-1}$ empleando agua residual estéril y no estéril respectivamente. Gao *et al.* (2016) reportaron una productividad de $7.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de biomasa con *Chlorella vulgaris* y $6.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de biomasa con *Scenedesmus obliquus* empleando como medio de cultivo efluente residual de tilapia, aireación continua y alimentado con CO_2 (pureza de 99.9 %) durante los 10 días de operación y a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, la productividad por lo reportado en esta investigación es mayor, lo cual, pudo deberse a la implementación del CO_2 . Al igual que Nuñez *et al.* (2020) reportaron una mayor producción de biomasa en su investigación, realizando monocultivos y co-cultivos con *Tetrademus obliquus* y *Chlorella vulgaris* en efluente estéril y no estéril, a un temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ obtuvieron una productividad de

0.752 ± 0.11 y 0.638 ± 0.67 mg L⁻¹ d⁻¹ respectivamente con *Tetrademus obliquus* y para *Chlorella vulgaris* de manera estéril 0.509 ± 0.08 y 0.440 ± 0.32 g/L/d de manera no estéril obteniendo resultados mayores a los de este estudio, sin embargo los cultivos se les adicione metales traça como estrés.

Así mismo, Halfhide *et al.*, (2014) reportaron resultados mayores de producción de biomasa que los mencionados en esta investigación, establecieron condiciones estériles y no estériles, obteniendo una productividad de biomasa (mg L⁻¹ h) para *Chlorella sp* de 4.89 ± 0.02 y 5.18 ± 0.18 mg L⁻¹ h respectivamente.

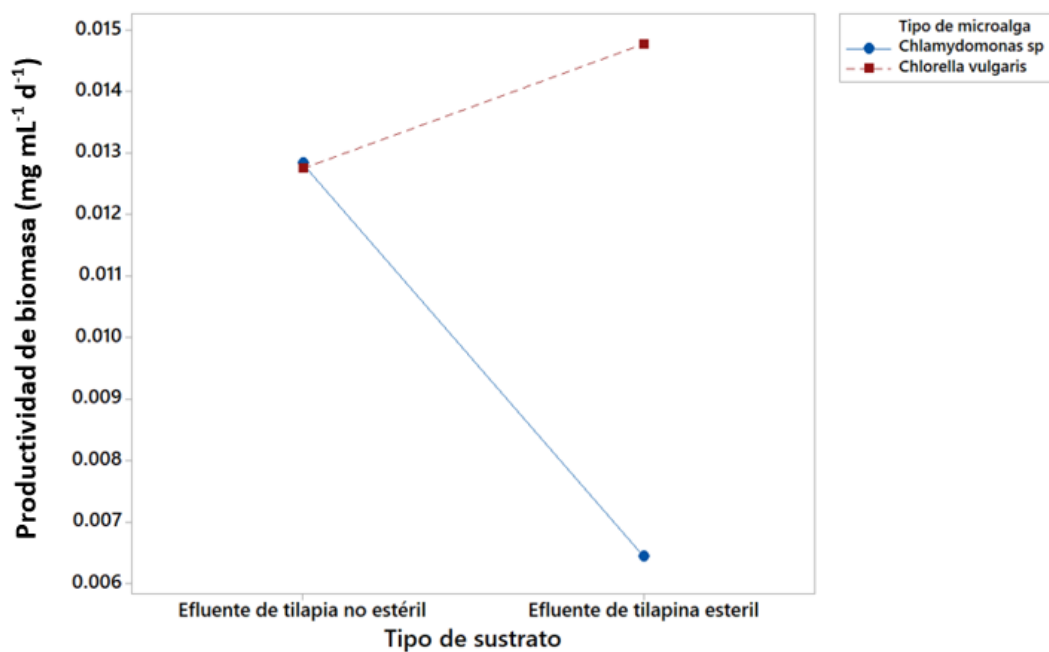


Figura 12. Interacción para la productividad de las cepas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* con respecto al tipo de efluente aplicado

7.2.5 Determinación de la producción y productividad lípidos cultivada controlada y a la intemperie

De acuerdo con la gráfica de efectos principales (Figura 13), la máxima producción en porcentaje (%) de contenido lipídico fue durante la fase exponencial con un porcentaje del 68.38 ± 2.97 y 67.99 ± 3.79 con las cepas *Chlorella vulgaris*, y *Chlamydomonas sp* respectivamente en agua residual no estéril. Ambas cepas presentaron porcentajes de lípidos menores en la fase estacionaria en comparación con la fase exponencial, *Chlorella*

vulgaris presentó un porcentaje lipídico en la fase estacionaria de 39.43 ± 3.79 %, y en la fase exponencial de 63.48 ± 2.97 %, obteniendo una diferencia de contenido lipídico entre ambas fases del 34.05 %, asimismo, para la cepa *Chlamydomonas sp* se obtuvo un contenido lipídico del 67.99 ± 3.79 % y 40.43 ± 2.81 % en la fase exponencial y estacionaria respectivamente, con una diferencia del contenido lipídico entre ambas fases del 27.56 %. En el trabajo de Kuo *et al.*, (2016) reportaron un porcentaje de contenido lipídico de 22.4 ± 1.6 % empleando *Chlorella sp* en efluente residual acuícola alimentado con un sistema semi continuo resultado comparable con este estudio, por otra parte, Apandi *et al.* (2018) emplearon la cepa *Scenedesmus sp* en 50 % del efluente residual del mercado de mariscos como medio de cultivo en reactores de 1000 mL, obteniendo 23.2 ± 0.98 %. Por otro lado, Yang *et al.*, (2019) reportaron un porcentaje de contenido lipídico en co-cultivo de *Chlorella vulgaris-Aspergillus sp* de 35.2 %, empleando efluentes residuales de melaza pretratadas, diversos estudios acerca de *Chlorella* se comprobado que producen más lípidos en un ambiente estresante o en condiciones adversas teniendo una capacidad de producción de lípidos de hasta el 77 % de su peso seco en comparación con las condiciones ideales de crecimiento. Por otro lado, Halfhide *et al.*, (2014) reportaron porcentajes de contenido lipídico de 12.5 ± 5.6 % y 50.4 ± 7.6 % de manera axénica y no axénica con *Chlorella sp*, de igual manera, con el consorcio mixto de especies nativas, reportaron porcentajes de contenido lipídico de 5.70 ± 2.40 % estéril y 23.4 ± 3.40 % de manera no estéril para *Scenedesmus sp*.

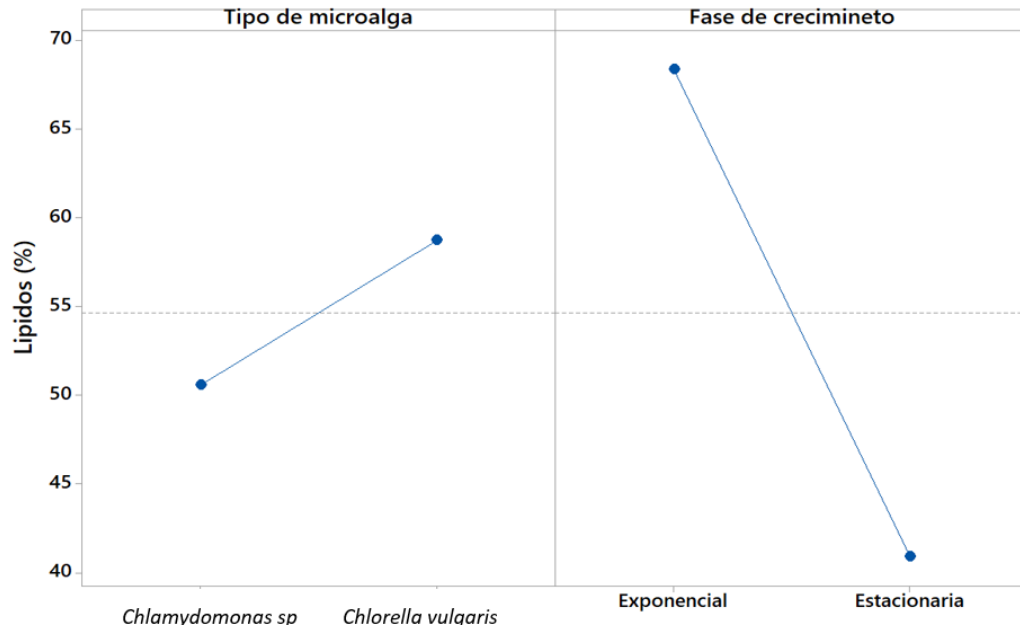


Figura 13. Efectos principales de lípidos en % de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris*

En la Tabla 6 muestra el promedio del porcentaje, producción y productividad del contenido lipídico para ambas cepas de microalgas obtenido en cada fase. Los mejores resultados se obtuvieron durante la fase exponencial en agua residual de tilapia no estéril y *Chlorella vulgaris*, obteniendo una producción y productividad de $0.10 \pm 0.006 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0.010 \pm 0.0009 \text{ mg mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de lípidos. En este tratamiento el tiempo y costo de esterilización es menor y se observó un aumento en el contenido lipídico comparado con *Chlamydomonas sp.* En el trabajo de Kirroliia *et al.* 2013 mencionan que *Chlorella vulgaris* cultivada en efluente de tilapia almaceno un mayor porcentaje de contenido lipídico considerando a este medio de cultivo un factor de estrés.

Tabla 6. Porcentaje del contenido lipídico durante la fase exponencial y estacionaria del empleo de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en efluente de tilapia

		<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Producción (mg mL^{-1})					
Exponencial		0.05 ± 0.001	0.089 ± 0.005	0.10 ± 0.006	0.08 ± 0.004
Estacionaria		0.04 ± 0.006	0.070 ± 0.006	0.11 ± 0.012	0.09 ± 0.016
Productividad ($\text{mg mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$)					
Exponencial		0.008 ± 0.001	0.01 ± 0.08	0.010 ± 0.0009	0.01 ± 0.01
Estacionaria		0.003 ± 0.005	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001

7.2.6 Fitorremediación en ambiente controlado y a la intemperie

En las Figuras 14 a 25 se presenta el comportamiento dinámico de los parámetros fisicoquímicos evaluados, como Amonio (NH^{4+}), Nitrito (NO^2), Nitrato (NO^3), Fosfato (PO_3^4), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y pH, durante el periodo de evaluación. En los primeros tres días, todos los tratamientos aplicados mostraron una remoción y disminución de cada uno de los parámetros.

A lo largo del tiempo de evaluación se encontraron algunos cambios en el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos. Para los tres tratamientos empleados con *Chlamydomonas sp*, los valores de amonio incrementaron progresivamente, como se muestra en la Figura 14. De manera similar, con la cepa *Chlorella vulgaris* en agua residual estéril y no estéril (Figura 15), se observó un pico de variación en los niveles de amonio en el día 6. Indicando que los tratamientos aplicados tuvieron un efecto inicial positivo en la remoción de nutrientes, pero posteriormente se observaron variaciones en la concentración de amonio en los diferentes tratamientos. Es importante considerar que la dinámica de los parámetros fisicoquímicos puede estar influenciada por diversos factores, incluyendo la composición del medio de cultivo, la actividad microalgal y la interacción entre las especies presentes. Los resultados sugieren que las microalgas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* tienen el potencial de remover nutrientes como el Amonio, Nitrito y Nitrato, contribuyendo así a la mejora de la calidad del agua residual de tilapia. Gou *et al.*, (2013), empleando efluente residual acuícola con ciclos de luz/obscuridad de 14 h/10 h, logro remociones de Amonio del 77.32 %, las remociones reportadas por casi todos los autores en sus investigaciones son superiores a los obtenidos en este estudio, ya que suplementan los cultivos con CO_2 o aplican un tratamiento previo a implementar el efluente como medio de cultivo lo cual permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes por las microalgas presentes en los efluentes acuícolas. Un ejemplo de esto es el trabajo de Kuo *et al.*, (2016) quienes emplean *Chlorella sp* en efluente residual acuícola, con aireación continua sin suministro de CO_2 con porcentajes de remoción del 60.71 % de Amonio.

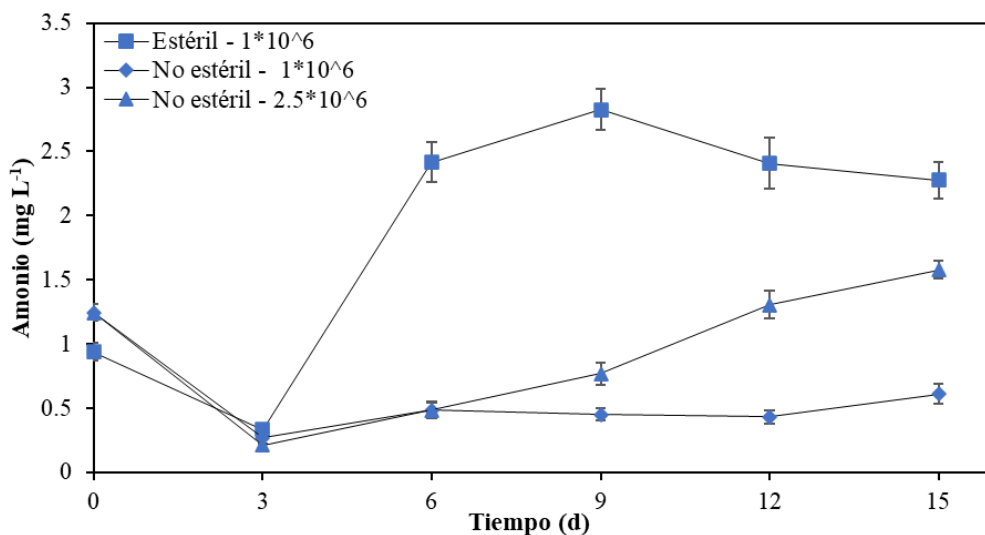


Figura 14. Comportamiento dinámico del Amonio (NH₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

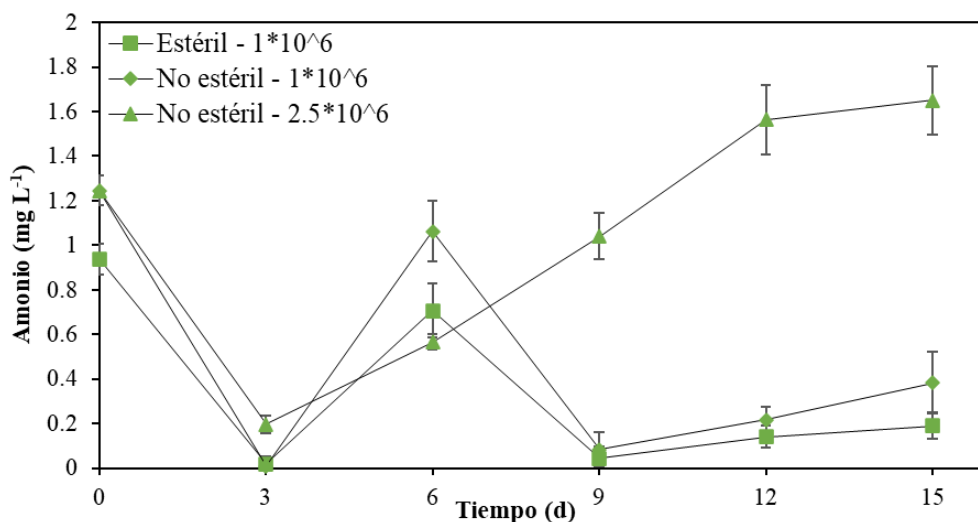


Figura 15. Comportamiento dinámico del Amonio (NH₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

En el caso de los nitritos (Figura 16 y 17) las microalgas lograron remediarlo en los primeros tres días. En el caso de los nitratos y observó que, en relación con el valor inicial, los niveles aumentaron en el día 6 y el día 12 hasta en un 20 % (Figura 17 y 18), respectivamente, en el caso de la cepa *Chlorella vulgaris* en agua residual no estéril con un inóculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹. Los valores de nitrato también presentaron un incremento. Petraglia *et al.*, (2018) empleando efluente residual de camarón de manera estéril con la cepa de la microalga *Amphora sp* obtuvo remociones de 72.54 % de Nitrato y 33.33 % de nitrito valores altos en comparación con este estudio por otro lado

Tejido-Nuñez *et al.*, (2020) empleando efluente acuícola de un sistema de recirculación de manera estéril y no estéril, en monocultivos y co-cultivos de las cepas de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Tetradasmus obliquus* obtuvo remociones de 98 % de nitrato en condiciones controladas.

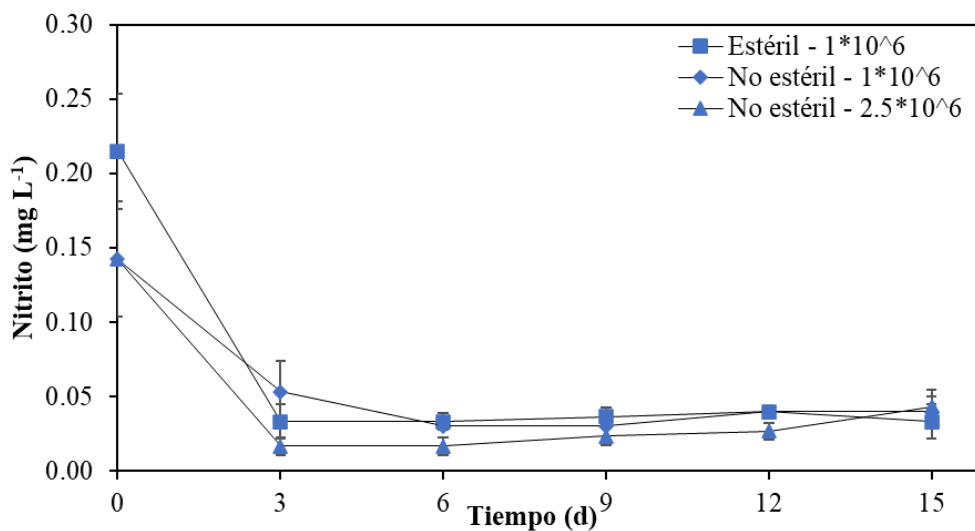


Figura 16. Comportamiento dinámico del Nitrito (NO₂) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

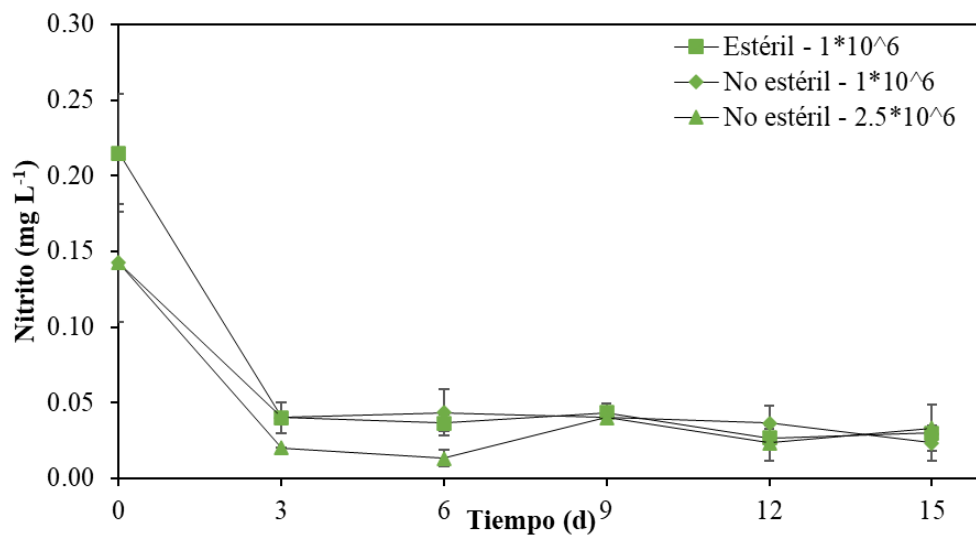


Figura 17. Comportamiento dinámico del Nitrito (NO₂) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

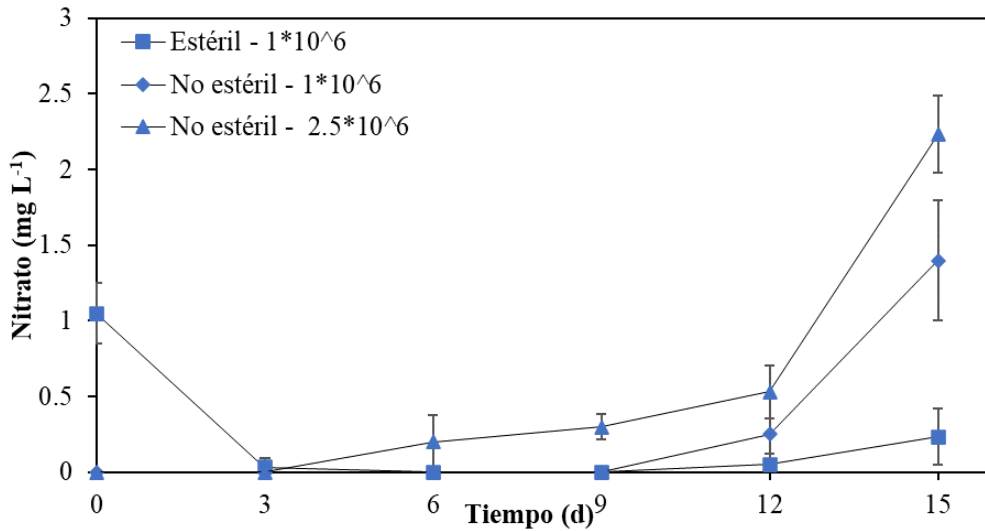


Figura 18. Comportamiento dinámico del Nitrato (NO₃) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

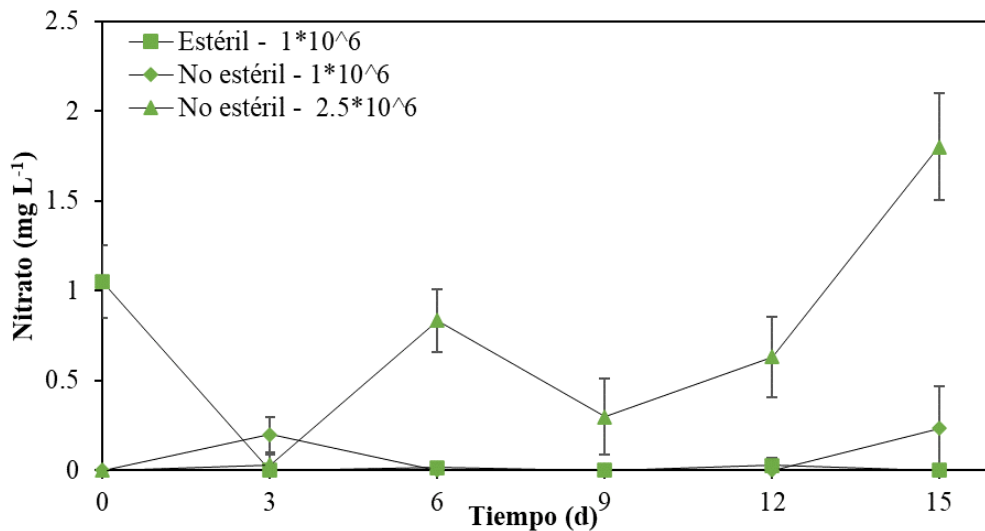


Figura 19 Comportamiento dinámico del Nitrato (NO₃) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

Por otro lado, el fosfato también mostró un incremento durante el periodo de operación. En la Figura 20 y 21, se observa el comportamiento del fosfato con la cepa *Chlamydomonas sp* en agua residual no estéril con un inoculo inicial de 2.5×10^6 cel mL⁻¹, donde se obtuvieron valores superiores a los iniciales. De manera similar, se presentaron incrementos de fosfato en los diversos tratamientos con la cepa *Chlorella vulgaris* (Figura 21). Obteniendo remoción de fosfato empleando agua residual estéril se removió fosfato de hasta 5.49 mg L⁻¹, y en agua residual no estéril, los valores oscilaron entre 4.81

y 5.42 mg L^{-1} , para los inóculos de 1×10^6 y $2.5 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados indican que la cepa *Chlorella vulgaris* es efectiva en la disminución de las concentraciones de fosfato en ambos tipos de agua residual. Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio muestran un potencial prometedor en el uso de *Chlorella vulgaris* para la remoción de fosfato en agua residual. Estas concentraciones finales de fosfato se encuentran dentro de los límites establecidos por la normativa NOM-001-SEMARNAT-2021 para la descarga en cuerpos de agua en bienes nacionales. Algunos autores sugieren que el uso de microalgas puede ser una estrategia eficiente y sostenible para la remoción de fosfato en efluentes acuícolas, lo que contribuiría a mejorar la calidad del agua y a cumplir con los estándares ambientales establecidos. En el trabajo de Viegas *et al.*, (2021) en su investigación realizada con efluente acuícola con las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis salina* y *Spirulina major*, obtuvieron rendimientos de remoción 100 % para fósforo. Por otro lado, Gao *et al.*, (2016) al implementar efluente residual acuícola con aireación continua suplementado con CO_2 alcanzo remociones de fósforo del 82.64 %.

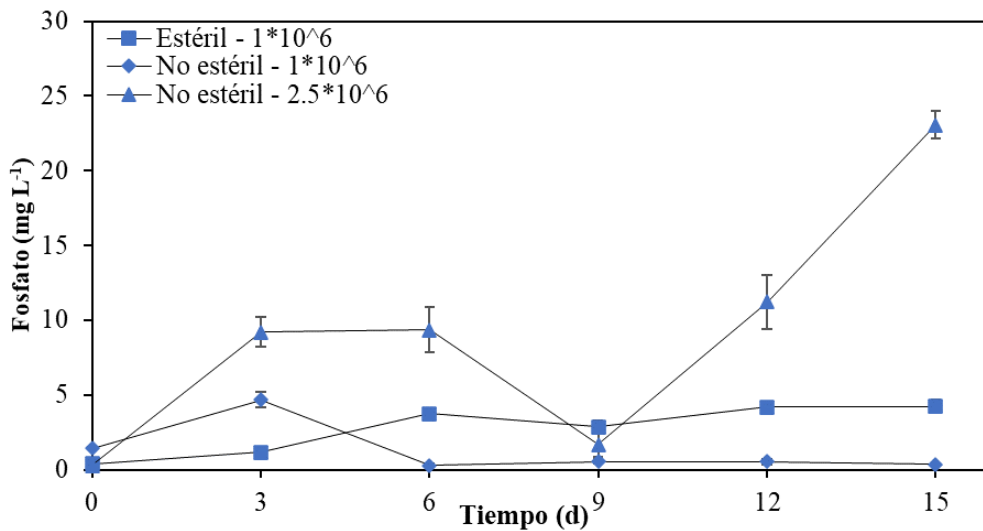


Figura 20. Comportamiento dinámico del Fosfato (PO_3^4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

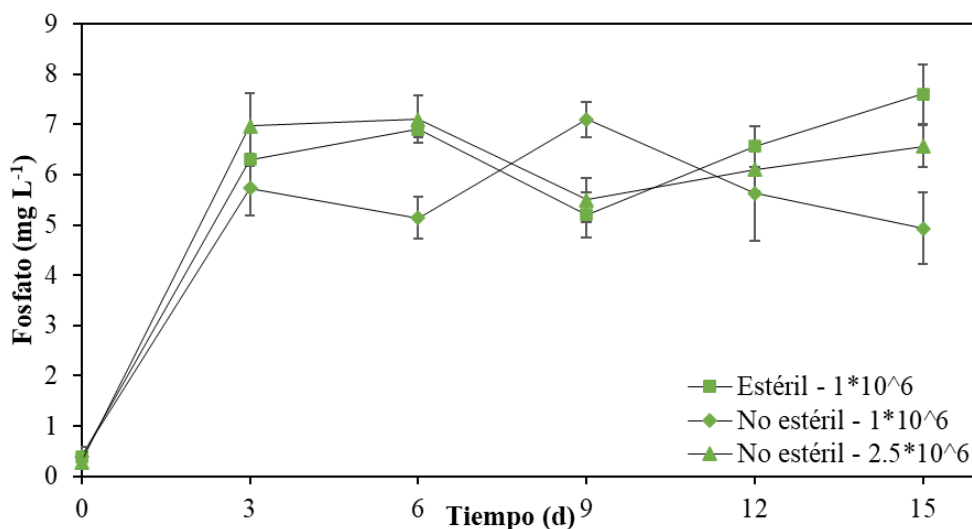


Figura 21. Comportamiento dinámico del Fosfato (PO_3^4) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

En la evaluación de los niveles de Demanda Química de Oxígeno (DQO) en el agua residual de tilapia tanto de manera estéril como no estéril con *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* Figura 22 y 23. De acuerdo con la norma NOM-001-SEMARNAT-2021, el límite máximo permisible de DQO es de 180 mg L^{-1} en promedio diario y 150 mg L^{-1} en promedio mensual. Al inicio del estudio, se encontró que el agua residual de tilapia presentaba una concentración de DQO de 358.3 mg L^{-1} de manera estéril y 279.2 mg L^{-1} de manera no estéril. Indicando la presencia de una carga considerable de materia y compuestos orgánicos presentes en el agua residual. El cultivo con *Chlamydomonas sp*, logro una reducción significativa en los niveles de DQO. En el caso del agua residual estéril, la concentración promedio disminuyó a 295.94 mg L^{-1} , mientras que, en el agua residual no estéril, se obtuvieron concentraciones finales de DQO de 217.46 mg L^{-1} y 304.54 mg L^{-1} para los inóculos de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $2.5 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente. Por otro lado, en el cultivo de *Chlorella vulgaris*, se obtuvieron concentraciones finales de DQO de 308.94 mg L^{-1} en el agua residual estéril y de 261.80 mg L^{-1} , y 266.34 mg L^{-1} en el agua residual no estéril, para los inóculos de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, y $2.5 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente. En comparación con Apandi *et al.*, (2018) reporta en su investigación en medio de cultivo efluente residual del mercado de mariscos con la cepa de la microalga *Scenedesmus sp* se logra una remoción de hasta el 9.89 % de DQO.

Sin embargo, aunque se logró remover una parte significativa de la DQO en todos los tratamientos con ambas cepas de microalgas, es importante destacar que las concentraciones finales de DQO aún superaron el límite máximo permisible establecido por la normativa. Estos resultados indican que, aunque las microalgas fueron eficientes en la remoción de DQO, es necesario implementar estrategias adicionales o mejorar las condiciones de cultivo para alcanzar los estándares ambientales requeridos (San, 2020). Algunos autores mencionan que es relevante considerar que la remoción de DQO puede verse afectada por diversos factores, como la composición del agua residual, la concentración de microalgas, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales. En futuras investigaciones, se pueden explorar diferentes enfoques y tecnologías para mejorar la eficiencia de remoción de DQO y cumplir con los estándares establecidos por la normativa (Rodríguez, 2020).

En general, los resultados obtenidos en este estudio indican que el cultivo de microalgas como *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* puede contribuir significativamente a la remoción de DQO en aguas residuales de Tilapia. Sin embargo, se requiere un mayor esfuerzo para alcanzar los límites permisibles establecidos por la normativa.

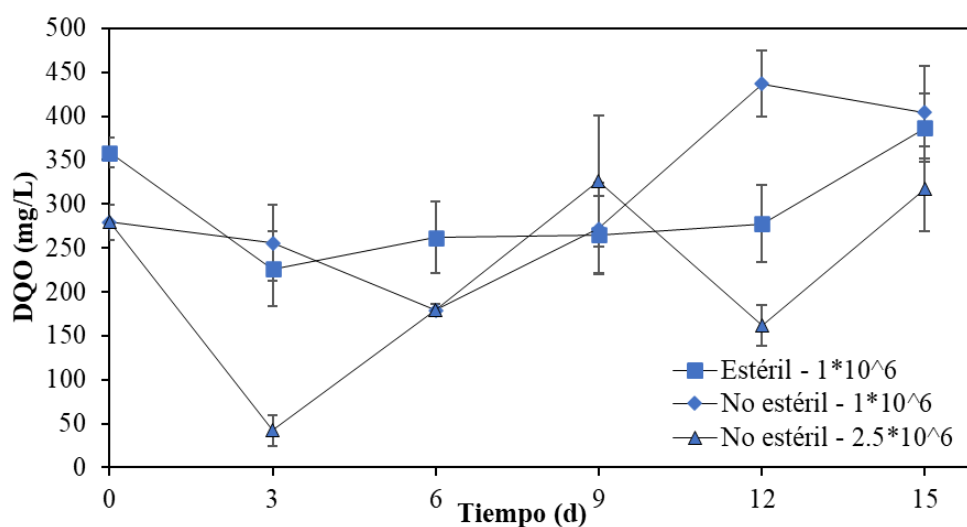


Figura 22. Comportamiento dinámico de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

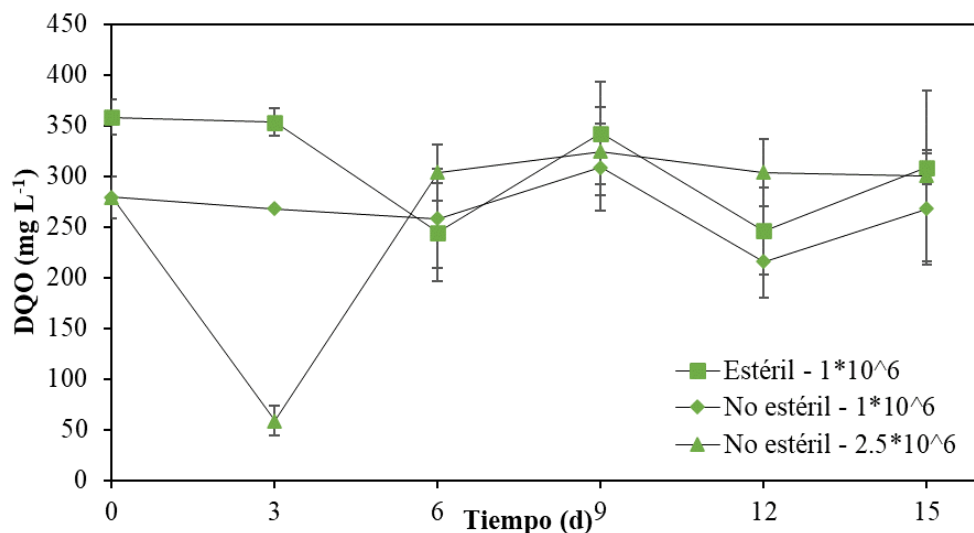


Figura 23. Comportamiento dinámico de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

De acuerdo con la norma "NOM-001-SEMARNAT-2021", que establece el rango límite de pH entre 6 y 9, se evaluaron los valores de pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril utilizada para el cultivo de ambas cepas de microalgas. Inicialmente, el agua residual de tilapia estéril presentó un pH de 6.86, mientras que el agua residual no estéril mostró un pH de 7.32. Durante el periodo de operación con la cepa *Chlamydomonas sp* (Figura 24), el agua residual estéril mantuvo un pH promedio de 6.51, mientras que el agua residual no estéril mostró valores de pH de 6.82 y 7.09 para los inóculos de 1×10^6 cel mL⁻¹ y 2.5×10^6 cel mL⁻¹, respectivamente. En el cultivo de la cepa *Chlorella vulgaris* (Figura 25) en agua residual estéril, se observó un pH de 6.87, mientras que en agua residual no estéril se obtuvo un pH de 7.07 y 7.08 para los inóculos de 1×10^6 cel mL⁻¹ y 2.5×10^6 cel mL⁻¹, respectivamente.

En general, los valores de pH registrados durante el cultivo de ambas cepas se mantuvieron dentro del rango establecido por la norma NOM-001-SEMARNAT-2021. Estos resultados indican que el proceso de cultivo de microalgas no afectó significativamente el pH del agua residual, lo que sugiere que las condiciones de cultivo fueron adecuadas y se ajustaron correctamente para mantener la estabilidad del pH. Por otro lado, es de importancia saber que la regulación y el monitoreo del pH son fundamentales para garantizar un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, ya que cambios drásticos en el pH pueden afectar negativamente su

metabolismo y rendimiento. En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio son alentadores y respaldan la viabilidad de utilizar microalgas como *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en el tratamiento de aguas residuales en la acuicultura, cumpliendo con los estándares ambientales establecidos.

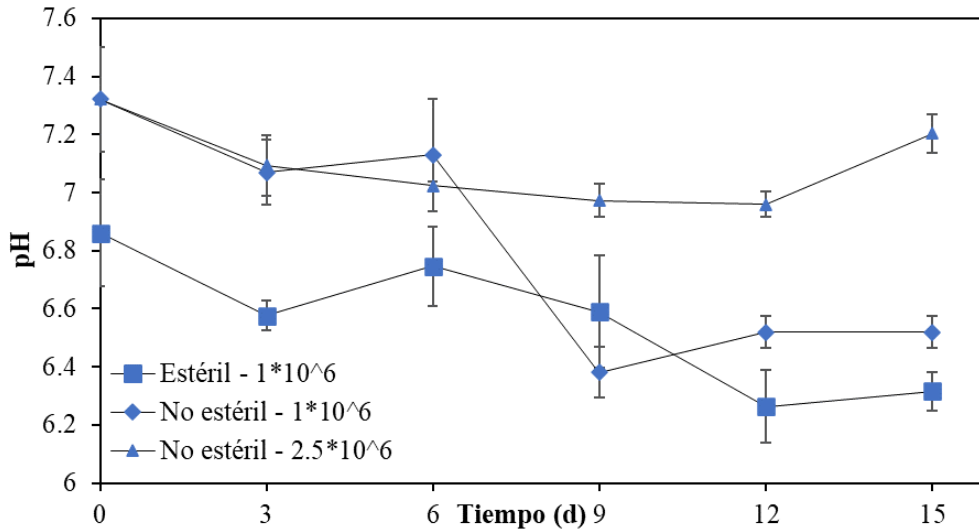


Figura 24. Comportamiento dinámico del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp*

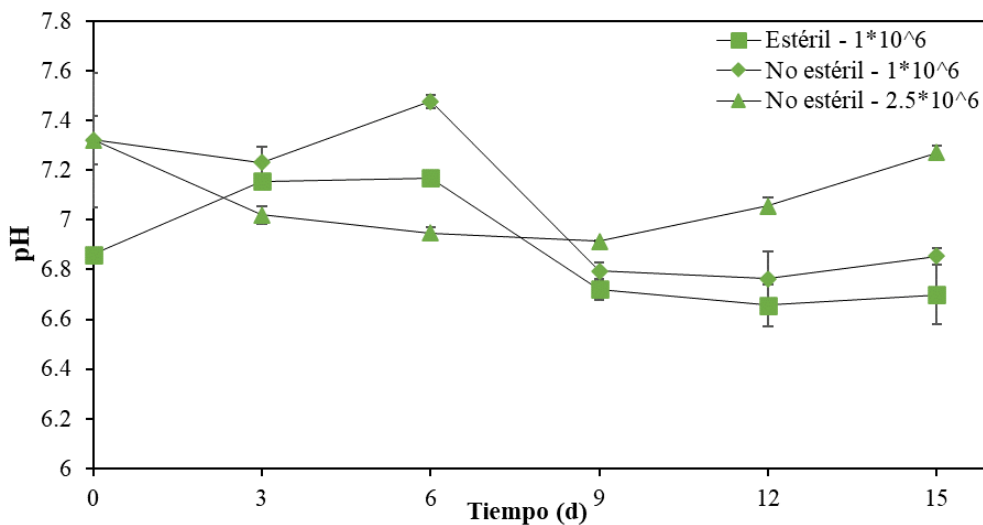


Figura 25. Comportamiento dinámico del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris*.

En la Tabla 7 se presenta un resumen general de los parámetros fisicoquímicos que fueron removidos por los diferentes tratamientos empleados en el estudio. Estos parámetros incluyen compuestos nitrogenados (como Amonio, Nitrito y Nitrato), Fosfato, Demanda

Química de Oxígeno (DQO) y pH. Se puede observar que los tratamientos con las cepas de microalgas *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris*, utilizando un inóculo inicial de 1×10^6 cel mL^{-1} en agua residual de tilapia y bajo condiciones controladas de laboratorio, lograron los mejores porcentajes de remoción de nutrientes. Indicando que las microalgas fueron efectivas en la remoción de diferentes nutrientes presentes en el agua residual de tilapia. Es importante destacar que estos resultados fueron obtenidos en condiciones controladas de laboratorio, lo que significa que se pudo mantener un control preciso sobre los factores ambientales que podrían influir en la eficiencia de remoción de los nutrientes por las microalgas. Sin embargo, estos resultados son alentadores y sugieren que las microalgas pueden ser una opción prometedora para el tratamiento de agua residual de tilapia y la remoción de nutrientes contaminantes.

Tabla 7. Promedio de eficiencia (η) de remoción total para ambas cepas de microalgas en el efluente residual de Tilapia estéril y no estéril.

	Parámetro (mg L ⁻¹)	<i>Chlamydomonas sp</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
		<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Remoción total (%)	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Remoción total (%)
Estéril (1x10 ⁶ cel mL ⁻¹)	Amonio	0.093 ± 0.01	1.86 ± 0.11	0.00	0.093 ± 0.01	0.33 ± 0.07	0.00
	Nitrito	0.22 ± 0.007	0.07 ± 0.007	68.18	0.22 ± 0.007	0.07 ± 0.03	54.54
	Nitrato	1.05 ± 0.35	0.23 ± 0.08	78.09	1.05 ± 0.35	0.04 ± 0.05	96.19
	Fosfato	0.38 ± 0.35	2.72 ± 0.35	0.00	0.38 ± 0.35	5.49 ± 0.31	0.00
	DQO	358.33 ± 17.09	295.94 ± 37.78	17.41	358.33 ± 17.09	308.94 ± 31.63	13.78
No estéril (1x10 ⁶ cel mL ⁻¹)	Amonio	1.24 ± 0.007	0.58 ± 0.04	34.67	1.24 ± 0.007	0.50 ± 0.07	59.67
	Nitrito	0.14 ± 0.007	0.06 ± 0.008	57.14	0.14 ± 0.007	0.05 ± 0.009	64.28
	Nitrato	0.0 ± 0.001	0.28 ± 0.10	0.0	0.0 ± 0.001	0.07 ± 0.05	0.00
	Fosfato	1.42 ± 0.10	1.31 ± 0.18	7.74	1.42 ± 0.10	4.81 ± 0.49	0.00
	DQO	279.27 ± 20.42	304.54 ± 35.42	0.00	279.27 ± 20.42	266.34 ± 33.95	4.62
No estéril (2.5x10 ⁶ cel mL ⁻¹)	Amonio	1.24 ± 0.007	0.93 ± 0.06	25	1.24 ± 0.007	1.04 ± 0.08	16.12
	Nitrito	0.14 ± 0.007	0.04 ± 0.01	71.4	0.14 ± 0.007	0.05 ± 0.01	64.28
	Nitrato	0.0 ± 0.001	0.54 ± 0.11	0.00	0.0 ± 0.001	0.60 ± 0.16	0.00
	Fosfato	1.42 ± 0.10	9.14 ± 1.01	0.00	1.42 ± 0.10	5.42 ± 0.41	0.00
	DQO	279.27 ± 20.42	217.46 ± 38.85	22.13	279.27 ± 20.42	261.80 ± 44.21	6.25

7.3 Fase 3. Implementación del modelo a la intemperie

7.3.1 Determinación de la producción y productividad de biomasa a la intemperie

En la Figura 26 se determinó la producción de biomasa a la intemperie durante la fase exponencial y estacionaria de cada tratamiento el promedio de la producción de la biomasa obtenida de acuerdo con la gráfica de efectos principales con una r-cuadrada de del 99.87%. El estudio reveló que la máxima producción de biomasa a intemperie ocurrió en agua residual estéril, alcanzando $0.652 \pm 0.005 \text{ mg mL}^{-1}$. Durante la fase exponencial de crecimiento, se registró un valor ligeramente inferior de $0.573 \pm 0.008 \text{ mg mL}^{-1}$, también en agua residual estéril utilizando *Chlamydomonas sp.* En el caso de *Chlorella vulgaris* el mayor rendimiento se presentó en la fase estacionaria y en agua residual estéril con un rendimiento de $0.650 \pm 0.040 \text{ mg mL}^{-1}$ y Tabla 8, logrando mejores rendimientos cuando se empleó un inóculo inicial de $2.5 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. Por esto se decidió implementarlo como método estándar para su aplicación tanto en agua residual estéril como no estéril, en ambas cepas de microalgas, en condiciones a intemperie. Lo reportado por Hende *et al.* (2014) para un floculo de microalgas *Chlorella vulgaris* en agua residual acuícola como medio de cultivo con es una producción de bimasa de $96 \pm 337 \text{ mg L}^{-1}$. Este rendimiento es alto en comparación con el de este estudio por lo que esta microalga podría producir mayor cantidad de biomasa.

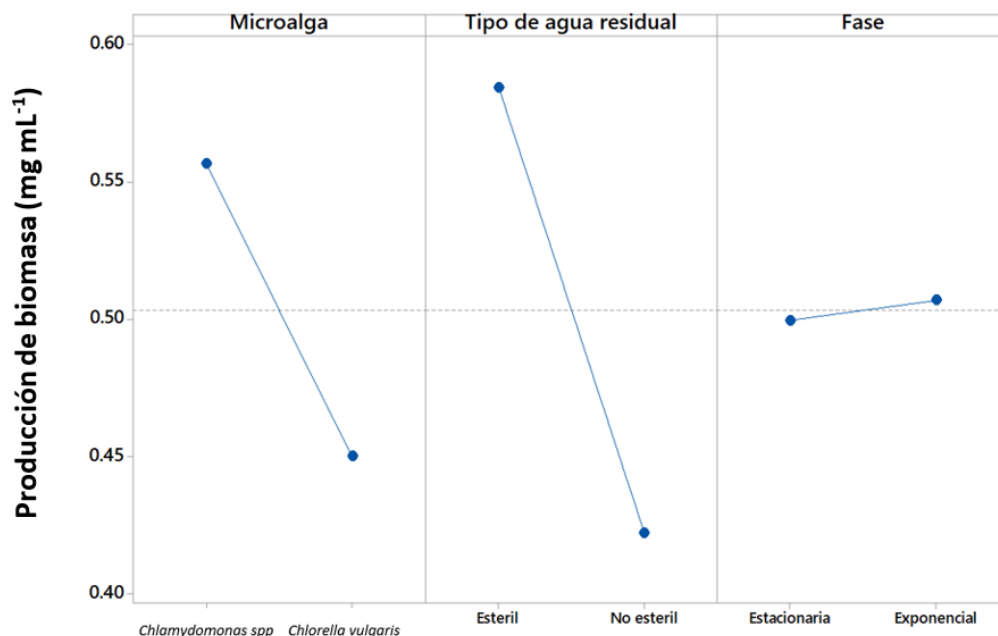


Figura 26. Producción de biomasa de *Chlamydomonas spp* y *Chlorella vulgaris*.

En la gráfica de interacción de los factores (Figura 27) se muestra el promedio de la productividad de la biomasa obtenida de acuerdo con la gráfica de efectos principales con una r-cuadrada de del 98.87. El estudio reveló que la máxima producción de biomasa a intemperie ocurrió en agua residual estéril, alcanzando $0.0932 \pm 0.0007 \text{ mg mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con *Chlamydomonas sp.* En el caso de *Chlorella vulgaris* el valor más alto fue de $0.0702 \pm 0.0084 \text{ mg mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en agua residual estéril durante la fase exponencial de crecimiento (Tabla 8). En el trabajo de Hasan *et al.* (2021) reportaron una productividad de biomasa de $0.12 \text{ mg L}^{-1}/\text{d}^{-1}$, empleando un co-cultivo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* en agua residual doméstica de la cafetería de la universidad de Khulna en Bangladesh como medio de cultivo en condiciones a la intemperie. Sin embargo, de acuerdo con lo reportado por reportado por Weerakkody *et al.* (2022) la producción de biomasa en agua residual acuícola obtuvo una producción de biomasa de $3.4 \pm 0.31 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, empleando *Sarcodia suae*. El rendimiento obtenido fue bajo en comparación con el de este estudio. Navarro *et al.*, (2022) obtuvieron una productividad de $77.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *Chlorella vulgaris* utilizando como medio de cultivo agua residual acuícola obtuvieron y lograron una productividad de $77.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ demostrando un mayor rendimiento en comparación con las microalgas de este estudio. Los autores mencionan que el agua fue suplementada con nutrientes para un mayor crecimiento.

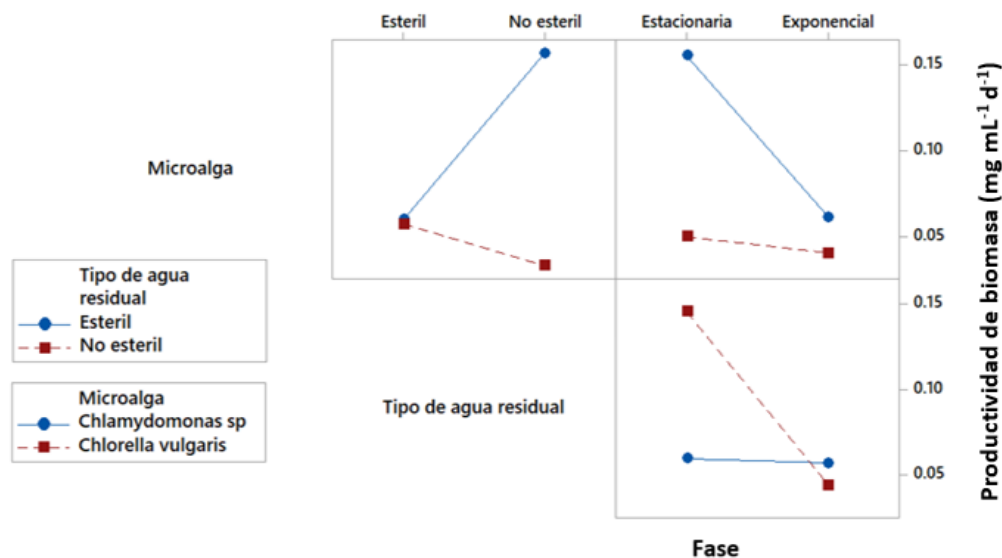


Figura 27. Interacción para la productividad de biomasa *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.

Tabla 8. Producción y productividad de biomasa a la intemperie durante las fase exponencial y estacionaria del empleo de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en efluente de tilapia estéril y no estéril.

Fase	<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
	Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	No Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	No Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})
Producción (mg mL^{-1})				
Exponencial	0.652 ± 0.005	0.573 ± 0.008	0.492 ± 0.059	0.317 ± 0.031
Estacionaria	0.544 ± 0.050	0.468 ± 0.045	0.650 ± 0.040	0.345 ± 0.032
Productividad ($\text{mg mL}^{-1} \text{d}^{-1}$)				
Exponencial	0.0932 ± 0.0007	0.0819 ± 0.0012	0.0702 ± 0.0084	0.0452 ± 0.0045

Estacionaria	0.0453 ± 0.0042	0.0390 ± 0.0038	0.0541 ± 0.0034	0.029 ± 0.003
--------------	---------------------	---------------------	---------------------	-------------------

7.3.2 Determinación de la producción y productividad de lípidos a la intemperie

De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 28), el tipo de agua residual y la fase de crecimiento influyen en el rendimiento lipídico, de acuerdo con la gráfica los valores máximos de porcentaje de contenido lipídico fueron durante la fase exponencial, la cepa *Chlorella vulgaris* alcanzó un 29.78 ± 1.59 % en un medio de agua residual no estéril. Por otra parte, durante la fase estacionaria y en un entorno de agua residual estéril, la cepa *Chlamydomonas sp* obtuvo un rendimiento 28.30 ± 2.09 % (Tabla 9). Lu *et al.* (2015) empleo como medio de cultivo efluente residual de una empresa láctea con la cepa de microalga *Chlorella sp* con porcentajes de 34.90 ± 3.21 % con respecto a la biomasa producida, así también Umamaheswari *et al.*, (2019) reporto al emplear como medio de cultivo agua residual del proceso de remojo de arroz en diferentes fotobiorreactores obtuvo un porcentaje de lípidos de 0.009, 0.007 y 0.002 % en *Chlorella vulgaris* siendo un valor bajo en comparación con el de este estudio. Smith *et al.* (2023), donde se señala cómo los factores medioambientales y de cultivo pueden desempeñar un papel crucial en el metabolismo lipídico de las microalgas. La comprensión de estas interacciones es fundamental para futuras estrategias de optimización y producción sostenible de lípidos.

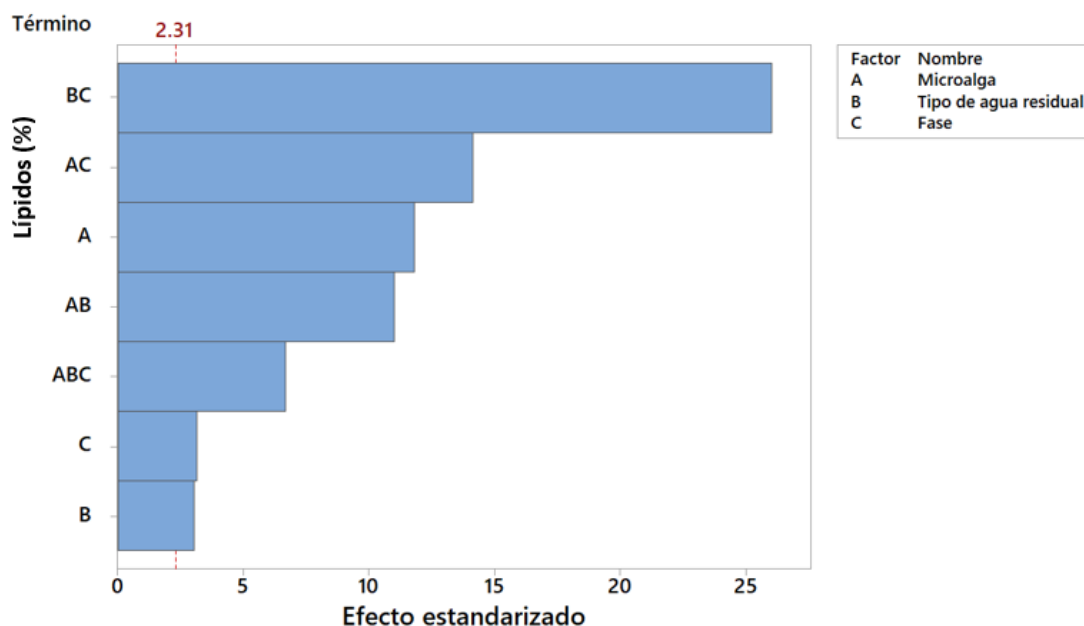


Figura 28. Diagrama de Pareto para los lípidos % de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.

En cuanto a la producción de lípidos en la Figura 29 se determinó el porcentaje del contenido lipídico producido a la intemperie durante la fase exponencial y estacionaria de cada tratamiento, con una r-cuadrada del 97.36 %, la mayor producción de lípidos con *Chlamydomonas sp* es de un $0.149 \pm 0.012 \text{ mg mL}^{-1}$ al emplear agua residual de tilapia estéril en durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Por otro lado, al utilizar agua residual no estéril, se observó un rendimiento ligeramente menor, alcanzando una producción de $0.104 \pm 0.007 \text{ mg mL}^{-1}$ de lípidos. En el caso de la microalga *Chlorella vulgaris*, se registró una menor producción de $0.086 \pm 0.008 \text{ mg mL}^{-1}$ cuando se utilizó agua residual no estéril en fase estacionaria de crecimiento. Petraglia *et al.*, (2018) demuestra que especies como *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorella* & *Ankistrodesmushan* demostrado altas eficiencias productivas asociadas de lípidos, carbohidratos y proteínas en sus biomásas.

Dentro del espectro de tratamientos evaluados, el análisis estadístico resalta la idoneidad de *Chlorella vulgaris* en fase estacionaria, mostrando una productividad de $0.165 \pm 0.010 \text{ mg mL}^{-1}$. Estos resultados demuestran la influencia de las fases de crecimiento para la extracción de lípidos de la biomasa además de la selección de especies microalgales para la producción lípidos. Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones han destacado la

importancia de las fases de crecimiento y las condiciones del medio para la máxima producción de lípidos en el estudio de Zhang et al. (2019) han resaltado cómo el ciclo de crecimiento de las microalgas puede afectar significativamente los rendimientos de lípidos obtenidos. Además, las investigaciones de Wang et al. (2020) han enfatizado la influencia del tipo de agua residual en la producción de biomasa lipídica, así como los cultivos en situaciones de estrés, como la limitación de nutrientes de las aguas residuales. Además, los resultados obtenidos corroboran la importancia de la selección de especies adecuadas, como *Chlorella vulgaris*, y la etapa específica del ciclo de crecimiento, como la fase estacionaria, para lograr un mayor rendimiento en la producción de biomasa utilizando aguas residuales.

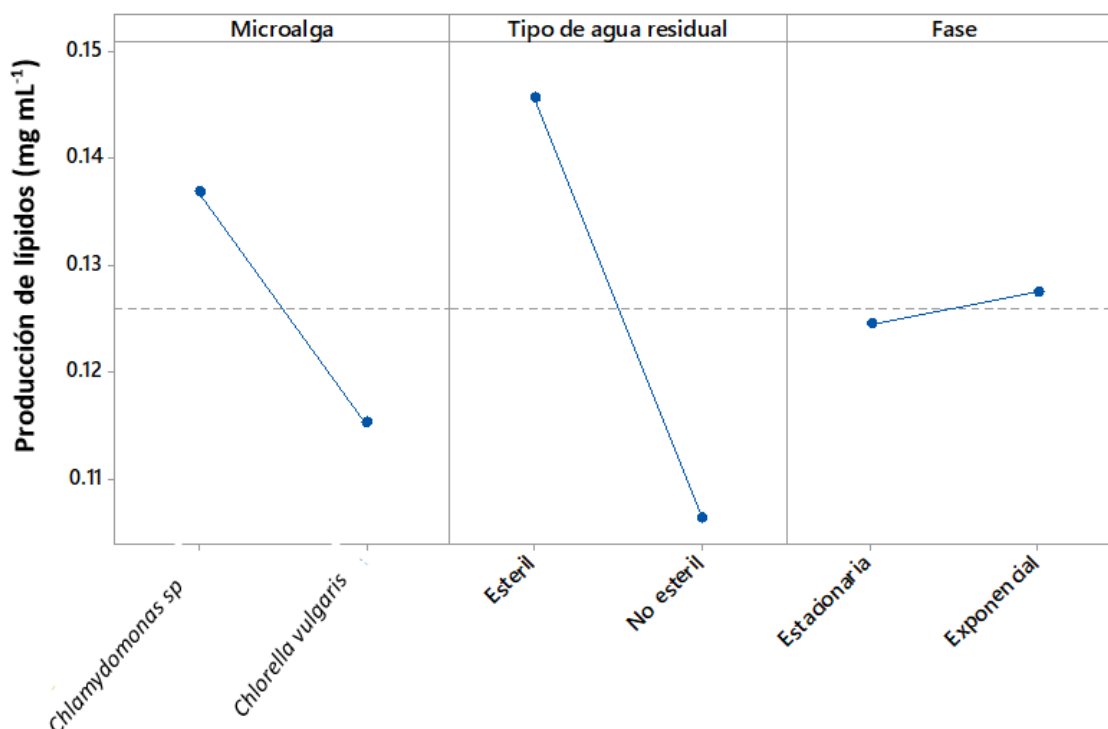


Figura 29. Producción de lípidos de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.

En la evaluación de la productividad entre *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris*, los resultados de acuerdo con la gráfica de interacción (Figura 30), se observó que la microalga *Chlamydomonas sp* alcanzó una producción máxima de 0.0211 ± 0.020 mg mL⁻¹ d⁻¹ en condiciones de agua residual de tilapia no estéril en fase estacionaria. Por otro lado, *Chlorella vulgaris* registró una producción máxima de 0.0138 ± 0.0008 mg mL⁻¹ d⁻¹ en fase estacionaria, pero bajo condiciones de agua residual estéril. De acuerdo con el análisis

estadístico la producción de lípidos con *Chlamydomonas sp* es superior a la de *Chlorella vulgaris* en las condiciones evaluadas. Algunos autores mencionan que *Chlamydomonas sp* posee la capacidad para prosperar en ambientes menos controlados. Por lo cual se le pueden dar aplicaciones industriales donde la esterilidad completa puede ser difícil de mantener de manera consistente para la producción de biomasa lipídica. Smith et al. (2023) destaca adaptabilidad y resistencia de este género en entornos menos estériles. Esta adaptabilidad puede ser una ventaja significativa para la producción a gran escala, donde las condiciones pueden variar y mantener una esterilidad absoluta puede resultar desafiante, siendo una elección prometedora para futuras aplicaciones en la producción sostenible de lípidos a partir de agua residual de tilapia.

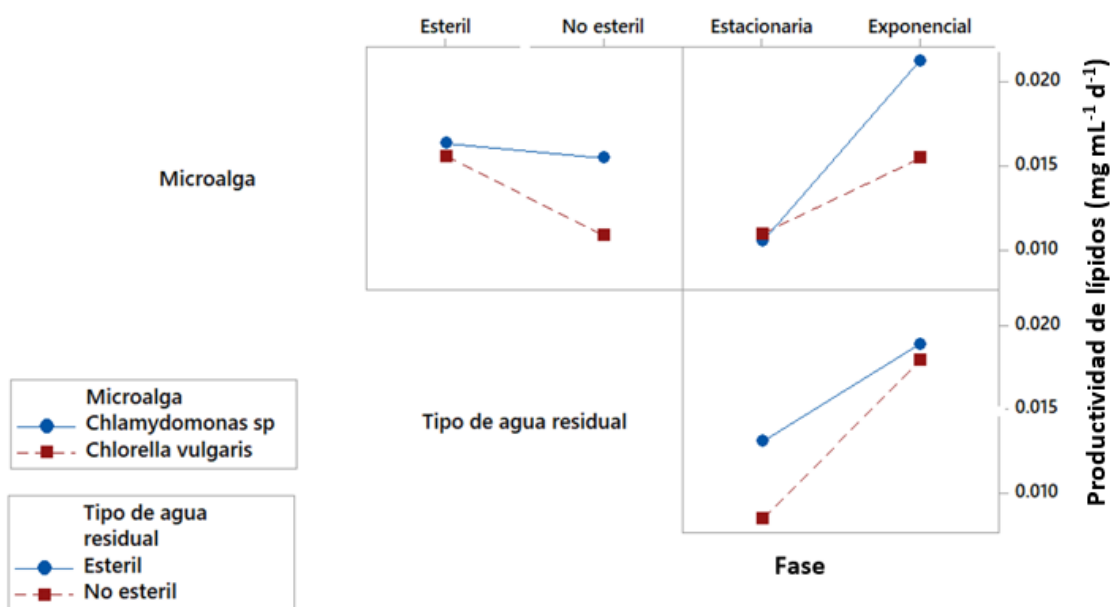


Figura 30. Interacción de la producción de lípidos de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie.

Tabla 9. Porcentaje del contenido lipídico a la intemperie durante la fase exponencial y estacionaria del empleo de *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en efluente de tilapia estéril y no estéril.

		<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Fase	Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	No Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	No Estéril (2.5×10^6 cel mL^{-1})	
Producción (mg mL^{-1})					
Exponencia 1	0.147 ± 0.012	0.148 ± 0.014	0.123 ± 0.008	0.093 ± 0.007	
Estacionaria	0.149 ± 0.012	0.104 ± 0.007	0.165 ± 0.010	0.086 ± 0.008	
Productividad ($\text{mg mL}^{-1} \text{d}^{-1}$)					
Exponencial	0.0209 ± 0.0018	0.0211 ± 0.0020	0.0176 ± 0.0012	0.0134 ± 0.0011	
Estacionaria	0.0124 ± 0.0010	0.0087 ± 0.0006	0.0138 ± 0.0008	0.007 ± 0.001	

7.3.3 Fitorremediación a la intemperie

En cuanto a la fitorremediación del agua residual a la intemperie los resultados se presentan en la Tabla 10, en la Figura 31 a la Figura 42, se observa el comportamiento dinámico de los componentes nitrogenados: Amonio (NH_4^+), Nitrito (NO_2) y Nitrato (NO_3), así también, el Fosfato (PO_3^4), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y pH.

En la remoción del amonio se observó un fenómeno contraproducente, en el día 12, se registran incrementos en la concentración de amonio tanto en el agua residual estéril como no estéril, en presencia de las cepas *Chlamydomonas sp* (Figura 31) y *Chlorella vulgaris* (Figura 32). De acuerdo con la literatura, las microalgas tienen la capacidad de influir en la concentración de amonio en el agua residual a través de su actividad metabólica y de fijación de nitrógeno. Sin embargo, la eficiencia de este proceso puede variar significativamente según varios factores, como la disponibilidad de nutrientes, la concentración inicial de amonio y las condiciones ambientales. Uno de los factores clave que podría contribuir al aumento temporal del amonio es el fenómeno conocido como "reversión del Amonio" (Carrillo, 2019). Esto se refiere al proceso por el cual las microalgas liberan Amonio nuevamente al medio acuoso debido a la descomposición de las células muertas o dañadas. Es posible que las condiciones específicas del cultivo, como la densidad de microalgas y las variaciones en la tasa de crecimiento, hayan

influido en la magnitud de este proceso. Si las condiciones no son óptimas para el crecimiento y la actividad metabólica de las microalgas, pueden desencadenar mecanismos de defensa que incluyen la liberación de amonio (Zhu *et al.*, 2019).

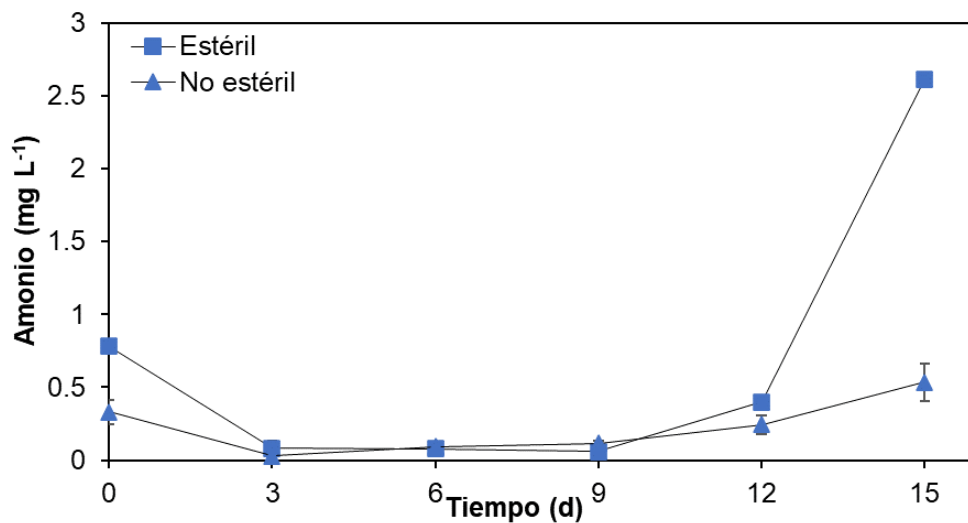


Figura 31. Concentración de Amonio (NH₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlamydomonas sp.* a la intemperie.

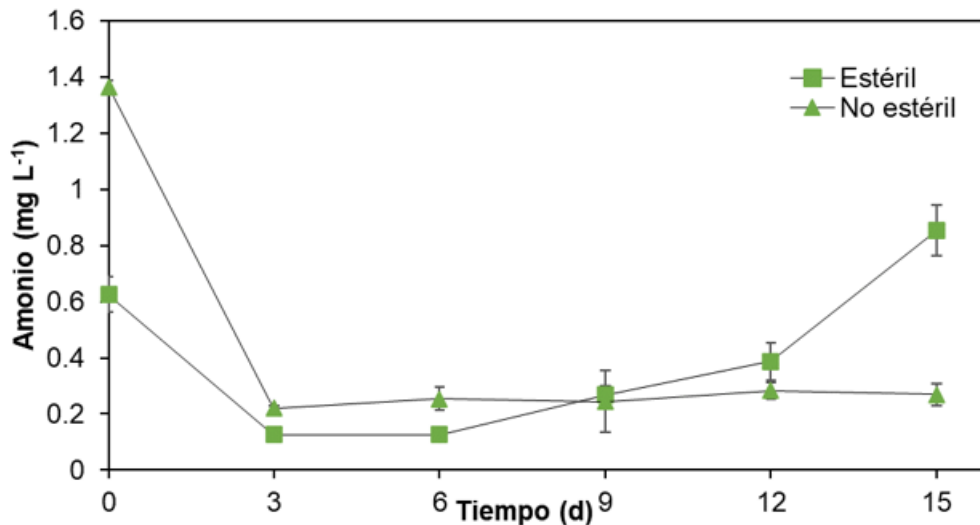


Figura 32. Concentración de Amonio (NH₄) en el agua residual de tilapia estéril y no estéril con *Chlorella vulgaris.* a la intemperie.

En la Figura 33, se observa el comportamiento de Nitrito empleando *Chlorella vulgaris* en el tratamiento de agua residual estéril, donde los niveles de Nitrito presentan incrementos superiores a los valores iniciales. Por otro lado, la Figura 34 muestra un patrón diferente con *Chlamydomonas sp.*, observando un pico en los niveles de Nitrito, y

luego se evidencia una disminución, la máxima remoción se registra entre el día 9 y el día 15 para ambos tratamientos. Este comportamiento en el aumento del Nitrito en el agua residual podría tener explicaciones basadas en los procesos metabólicos y la respuesta de las microalgas a las condiciones del entorno. De acuerdo con Pandit & Fulekar, (2019) cuando las microalgas se exponen a condiciones subóptimas, como cambios bruscos en las concentraciones de nutrientes, luz y temperatura, pueden desencadenar respuestas de estrés. En lugar de concentrarse en la asimilación y remoción de Nitrito, las microalgas podrían canalizar su energía hacia mecanismos de defensa y adaptación, lo que podría resultar en incrementos observables en los niveles de Nitrito en el agua residual. De igual forma, la presencia de compuestos químicos en el agua residual, como Amonio y Nitrato, también puede influir en el equilibrio y la conversión entre diferentes formas de Nitrógeno, incluyendo el Nitrito. Cambios en la concentración de uno de estos compuestos podría afectar la dinámica de conversión y, en consecuencia, llevar a observaciones inesperadas en la concentración de Nitrito (Bindra & Kulshrestha, 2019).

La Tabla 10, se observa que tanto *Chlamydomonas sp* como *Chlorella vulgaris* lograron remoción significativa de Nitrito en agua residual de tilapia, tanto estéril como no estéril, en condiciones a la intemperie. En comparación, en el modelo controlado utilizando *Chlamydomonas sp*, se alcanzó una remoción de hasta un 68 % utilizando agua residual estéril. Los resultados demuestran que las condiciones a la intemperie pueden favorecer un mayor rendimiento en términos de remoción de nitrito por parte de las microalgas, en comparación con las condiciones controladas. Existen varios factores que podrían contribuir a esta diferencia con lo reportado en la literatura como la intensidad de la luz solar y las condiciones ambientales, la exposición a la luz solar directa y las variaciones diurnas de temperatura pueden estimular una mayor tasa de fotosíntesis y, por lo tanto, un mayor consumo de nutrientes como nitrito (Guimarães et al., 2020).

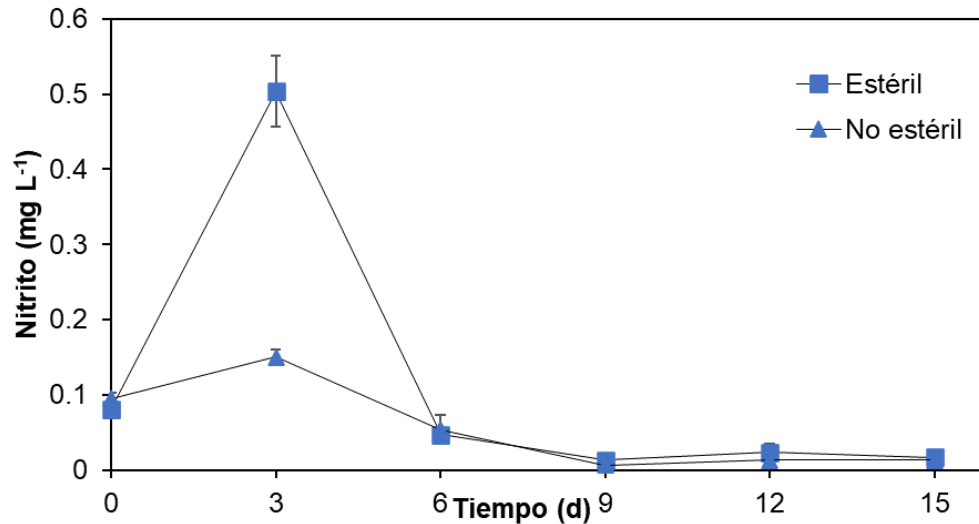


Figura 33. Concentración del Nitrito en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlamydomonas sp* a la intemperie.

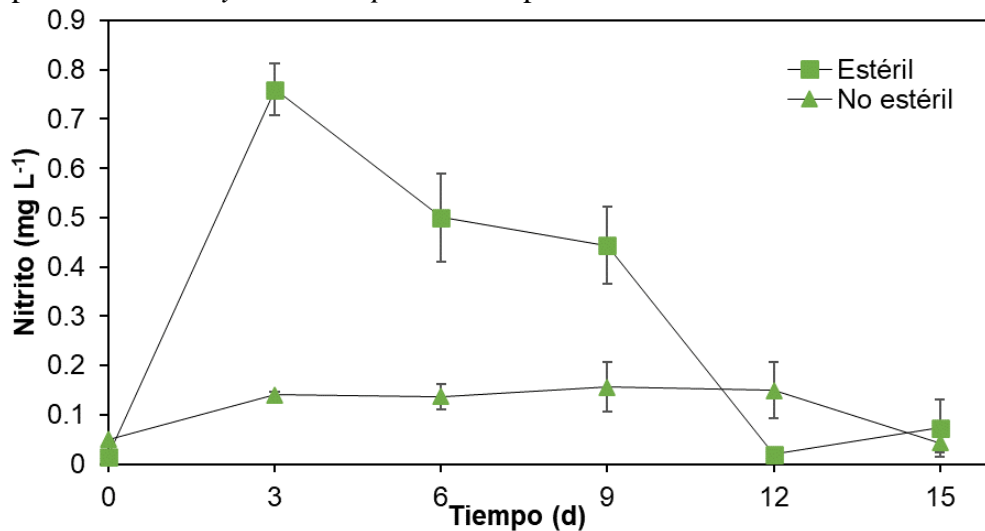


Figura 34. Concentración de Nitrito en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlorella vulgaris* a la intemperie.

En la Figura 35 se observa la concentración de nitrato con *Chlamydomonas sp.* La concentración menor se observó del día 6 hasta el día 15 en agua residual no estéril. Por otro lado, con *Chlorella vulgaris* en agua residual no estéril, se observa una reducción paulatina hasta el día 15 como se muestra en la Figura 36. Por otro lado, en la Tabla 10, se observa que la mayor remoción de Nitrato se alcanzó en el modelo control utilizando *Chlorella vulgaris* en agua residual estéril de tilapia, logrando una eficiencia de remoción del 96.19 %. Por otro lado, en el modelo a la intemperie, la mayor remoción se obtuvo con *Chlamydomonas sp* en agua residual no estéril, logrando una remoción del 90.62 %. Hasan et al. (2021) realizaron un estudio con

agua residual doméstica, logrando una remoción del 80 % de Nitrito utilizando *Chlorella vulgaris*. Este estudio se llevó a cabo a una temperatura promedio de 35 ± 3 °C y con una iluminación natural promedio de 4139.64 ± 187.16 lux. En comparación, nuestro estudio muestra rendimientos de remoción superiores.

En otro estudio, Navarro et al. (2022) emplearon la cepa *Tetraselmis chui* en agua residual acuícola en dos configuraciones experimentales a la intemperie: un sistema por lotes y un sistema semicontinuo. En el primer set experimental, sin alimentación de Fosforo, se logró una remoción del 48.33 % de Nitrato en el sistema por lotes, un 45 % en el sistema semicontinuo. En el segundo set experimental, con alimentación de Fosforo, la remoción de Nitrato aumentó a un 60 % en el sistema por lotes y a un 50 % en el sistema semicontinuo. Comparando con estos estudios de referencia, los resultados de remoción de Nitrato están comparables con los demás.

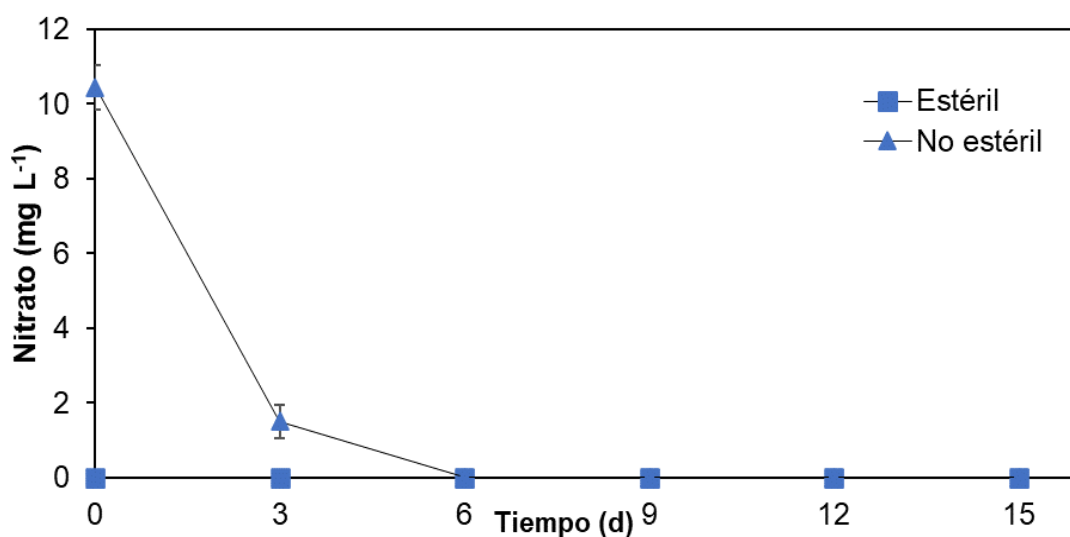


Figura 35. Concentración de Nitrato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlamydomonas sp* a la intemperie.

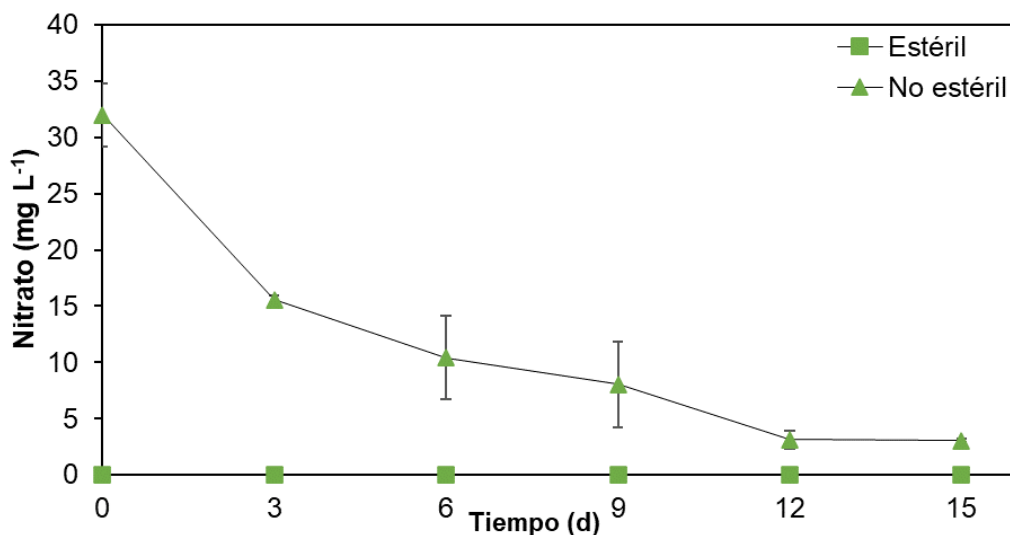


Figura 36. Concentración de Nitrato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlorella vulgaris* a la intemperie.

Las concentraciones establecidas por la NOM-001-SEMARNAT-2021 para el Fosfato (PO34) son de 18 mg L⁻¹ en promedio diario y 15 mg L⁻¹ en promedio mensual. En relación con el efluente de tilapia durante el período de operación inicial a la intemperie, se obtuvieron concentraciones de 14.33 mg L⁻¹ de manera estéril y 13.00 mg L⁻¹ de manera no estéril. Al finalizar el ciclo de cultivo con *Chlamydomonas sp*, las concentraciones en el efluente estéril disminuyeron a 12.09 mg L⁻¹, mientras que en el efluente no estéril a 8.93 mg L⁻¹ (Figura 37). Cuando se utilizó *Chlorella vulgaris* (Figura 38), las concentraciones al final del ciclo de operación fueron de 17.73 mg L⁻¹ en el efluente estéril y de 9.22 mg L⁻¹ en el no estéril, siendo ligeramente mayores en comparación con *Chlamydomonas sp*.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 10, se observa que tanto *Chlamydomonas sp* como *Chlorella vulgaris* no lograron una remoción significativa del Fosfato en el agua residual estéril como no estéril, bajo condiciones controladas. En comparación, en el modelo a la intemperie, la remoción más destacada fue del 31.30 % con *Chlamydomonas sp* utilizando agua residual estéril. En un estudio realizado por Hasan et al. (2021) utilizó agua residual doméstica y logró una remoción del 26.33 % de Fosfato, empleando una temperatura promedio de 35 ± 3 °C y luz natural promedio. Por otro lado, en una investigación realizada por Nuñez et al. (2020), se emplearon las cepas *Chlorella vulgaris* y *Tetrademus obliquus* en agua residual acuícola, tanto estéril como

no estéril, logrando una remoción del 97.65 % de Fosfato. En el trabajo de Weerakkody *et al.* (2022), la cepa *Sarcodia suae* se utilizó en agua residual de tilapia, en diferentes estaciones durante 2 años, obteniendo una remoción promedio del 66.21 % de Fosfato, con el máximo rendimiento en la temporada de invierno. Lu *et al.* (2015) emplearon *Chlorella sp* en agua residual de una empresa láctea al aire libre y lograron una remoción del 66.68 % de Fosfato. Los resultados de remoción, en comparación con los reportados en la literatura, son inferiores. Esto puede deberse a que muchos de estos estudios anteriores implementaron suplementación con Dióxido de carbono o aplicaron tratamientos previos al agua residual como medio de cultivo, permitiendo una mejor utilización de los nutrientes por parte de las microalgas presentes en los efluentes acuícolas.

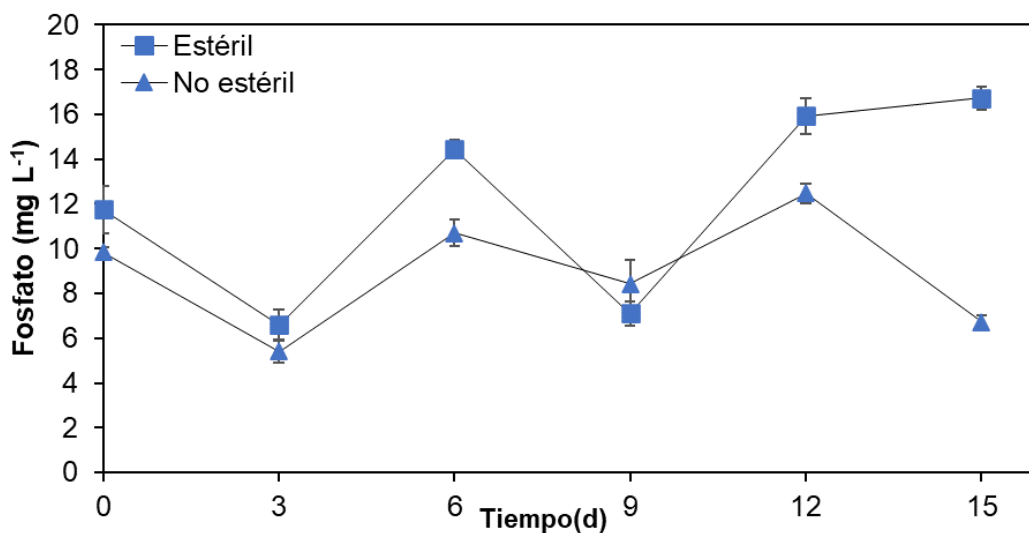


Figura 37. Concentración de Fosfato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlamydomonas sp* a la intemperie.

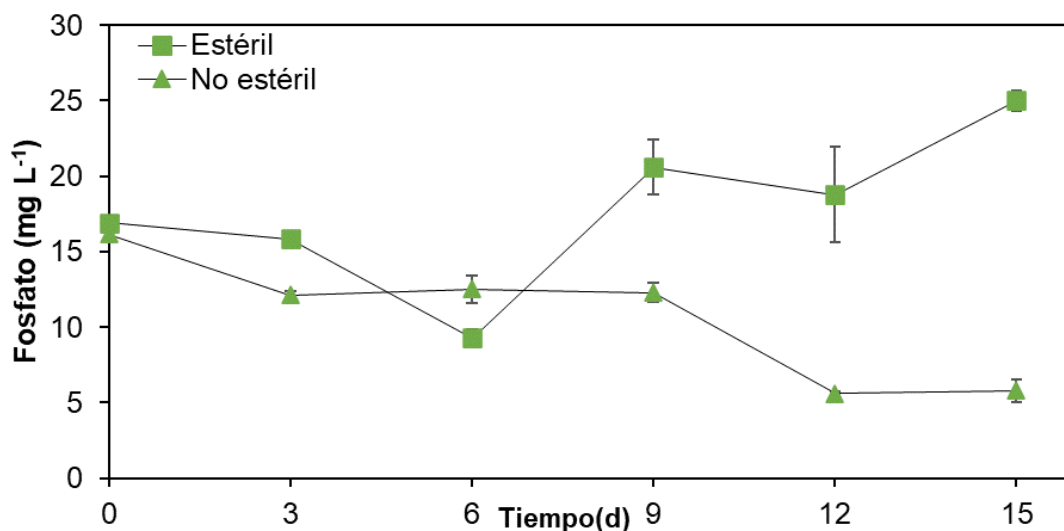


Figura 38. Concentración de Fosfato en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlorella vulgaris* a la intemperie.

En relación con la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la NOM-001-SEMARNAT-2021 establece límites de 180 mg L⁻¹ en promedio diario y 150 mg L⁻¹ en promedio mensual para el agua residual, con la cepa *Chlamydomonas sp*, en agua residual estéril (Figura 39), se obtuvo una remoción del 165.62 mg L⁻¹ siendo la más alta, mientras que, en el agua residual no estéril, la concentración al finalizar el cultivo fue de 112.78 mg L⁻¹. En el caso de *Chlorella vulgaris* (Figura 40), la remoción en agua residual estéril fue de 135.35 mg L⁻¹, mientras que en agua residual no estéril fue de 89.08 mg L⁻¹. Es importante destacar que la concentración final de DQO en agua residual estéril con *Chlamydomonas sp* resultó insuficiente en términos de cumplimiento con los límites de descarga permitidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021. En este caso, la concentración final supera el límite establecido por la normativa vigente.

Los datos presentados en la Tabla 10, se puede observar que *Chlamydomonas sp* no logró remoción significativa de DQO en el agua residual estéril. La mayor eficiencia de remoción con esta cepa se obtuvo en el modelo a intemperie, alcanzando un 31.60 %. Por otro lado, *Chlorella vulgaris* mostró un bajo rendimiento de remoción del 4.62 % en agua residual no estéril en condiciones controladas, mientras que, en el ambiente a intemperie, la remoción más alta de DQO fue del 45.97 % empleando agua residual no estéril siendo la remoción más alta en este estudio, Hasan *et al.* (2021) llevaron a cabo un estudio con agua residual doméstica, logrando una remoción del 92.59 % de DQO utilizando *Chlorella vulgaris*, a

una temperatura promedio de 35 ± 3 °C y luz natural. Por otro lado, en el trabajo de Lu *et al.* (2015), emplearon la cepa *Chlorella sp* en agua residual de una empresa láctea a la intemperie en diferentes concentraciones (5 %, 10 % y 25 %), obteniendo remociones de DQO del 21.99 %, 38.88 % y 54.82 %, respectivamente y algunas remociones se pueden comparar con las de este estudio, al igual que en el estudio de Van Den Hende *et al.* (2014), donde emplearon *Chlorella vulgaris* en efluente acuícola con aireación suplementada con CO₂, logrando una remoción del 28 % de DQO.

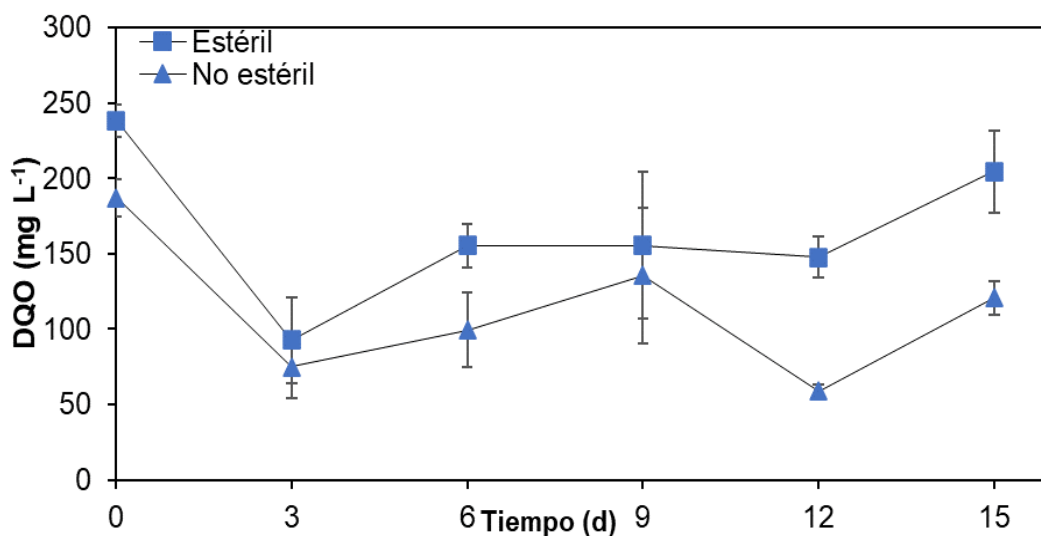


Figura 39. Comportamiento de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlamydomonas sp* a la intemperie.

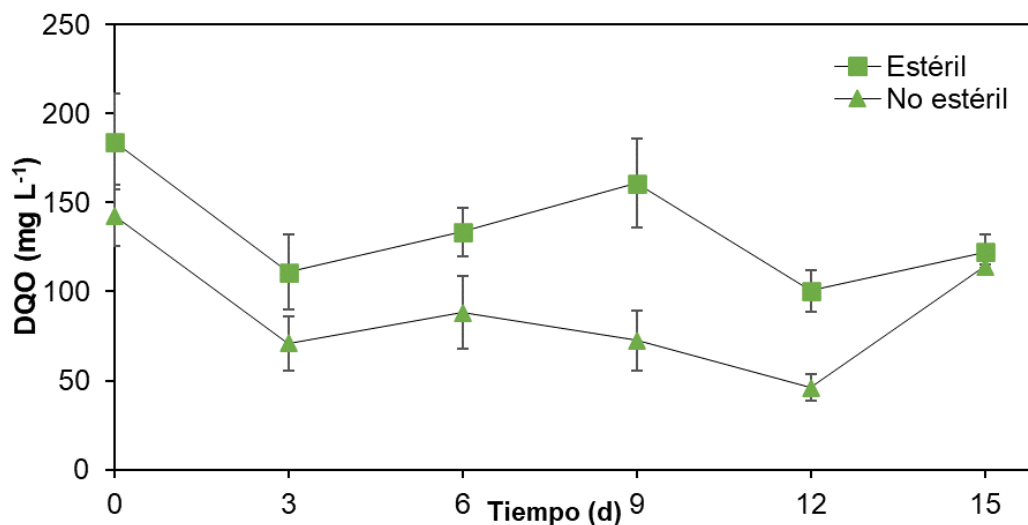


Figura 40. Comportamiento de la DQO en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlorella vulgaris* a la intemperie.

De acuerdo con el pH obtenido en el periodo de operación para la cepa *Chlamydomonas sp* (Figura 41) y *Chlorella vulgaris* (Figura 42), se observó un similar entre ambas cinéticas y tratamientos, obteniendo que; el pH aumento en los 3 primeros días y durante el tiempo restante de operación. Asimismo, la norma establece un rango de pH permitido de 6 a 9. Al inicio del cultivo de ambas cepas de microalgas, los valores de pH del efluente fueron de 6.09 de manera estéril y 7.28 de manera no estéril. Al finalizar el ciclo de cultivo con *Chlamydomonas sp*, los valores de pH en el efluente estéril aumentaron a 7.72, mientras que en el efluente no estéril se situaron entre 8.41. Cuando se empleó *Chlorella vulgaris*, los valores de pH al final del ciclo fueron de 7.66 en el efluente estéril y de 8.08 en el no estéril a pesar de las fluctuaciones a lo largo del período de operación, ninguno de estos parámetros excedió los límites permitidos establecidos por la NOM.

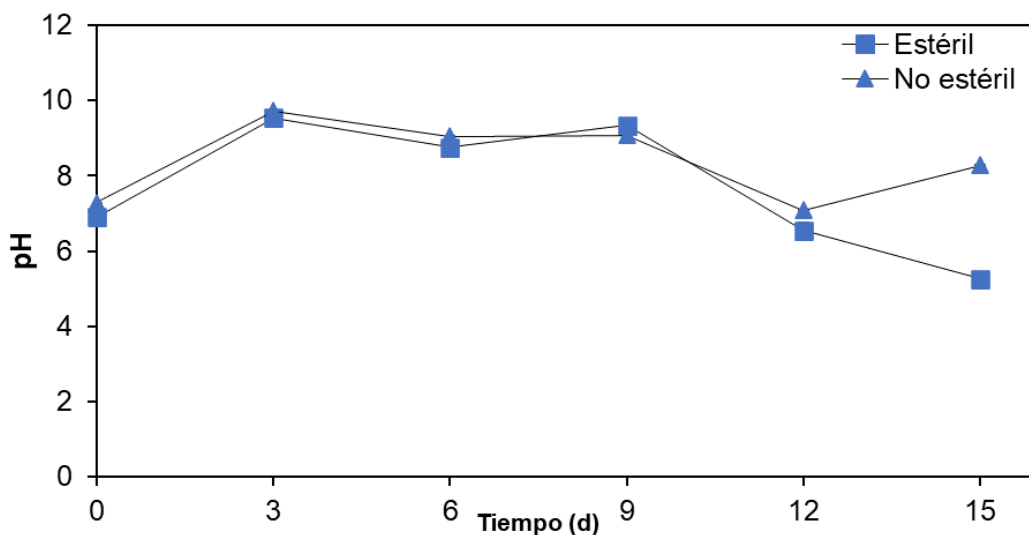


Figura 41. Comportamiento del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlamydomonas sp* a la intemperie.

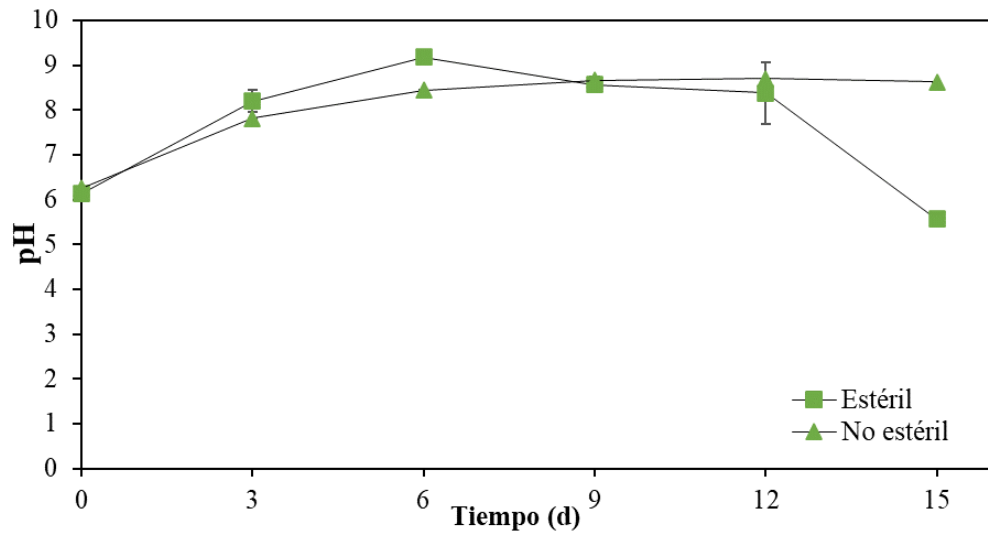


Figura 42. Comportamiento del pH en el agua residual de tilapia estéril y no estéril a la intemperie con *Chlorella vulgaris* a la intemperie.

Tabla 10. Comparación de los promedios de eficiencia (η) de remoción total para ambas cepas de microalgas en el efluente residual de tilapia estéril y no estéril en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie.

Tipo	Parámetro	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
		<i>sp</i>	
		Remoción total (%)	Remoción total (%)
Estéril (1×10^6 cel mL ⁻¹)	Amonio	0.00	0.00
	Nitrito	68.18	54.54
	Nitrato	78.09	96.19
	Fosfato	0.000	0.000
	DQO	17.41	13.78
No estéril (1×10^6 cel mL ⁻¹)	Amonio	34.67	59.67
	Nitrito	57.14	64.28
	Nitrato	0.0	0.00
	Fosfato	7.74	0.00
	DQO	0.00	4.62
A la intemperie			
Estéril (2.5×10^6 cel mL ⁻¹)	Amonio	4.71	43.42
	Nitrito	0.00	0.00
	Nitrato	0.00	0.00
	Fosfato	15.59	0.00
	DQO	20.83	35.30
No estéril (2.5×10^6 cel mL ⁻¹)	Amonio	73.45	48.18
	Nitrito	26.30	0.00
	Nitrato	90.62	43.31
	Fosfato	31.30	29.10
	DQO	31.60	45.97

7.3.4 Comparación de la biomasa, contenido lipídico y ficorremediación lograda en condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie

En la producción de biomasa de acuerdo con la tabla *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* bajo condiciones controladas y a la intemperie. En particular, se destaca que la intensidad lumínica en el laboratorio alcanzó 2800 lux, lo cual resultó en una producción máxima de biomasa con *Chlamydomonas sp*. En esta configuración, se lograron 438 ± 0.02 mg mL⁻¹ en la fase exponencial y 0.501 ± 0.03 mg mL⁻¹ en la fase estacionaria en agua residual de tilapia no estéril. En contraste, las condiciones a la intemperie proporcionaron un promedio diario de 6753.47 ± 2214.2 lux, obteniendo una producción más alta de 0.652

$\pm 0.005 \text{ mg mL}^{-1}$ en la fase exponencial y $0.544 \pm 0.050 \text{ mg mL}^{-1}$ en la fase estacionaria con *Chlamydomonas sp* en agua residual estéril obteniendo mayores resultados con el cultivo a la intemperie. De acuerdo con la relación entre la intensidad lumínica y la producción de biomasa en cultivos microalgales, numerosos estudios como los de Barraza 2017 y Beltrán 2014 han concordado en que una mayor intensidad lumínica está asociada con una mayor producción de biomasa microalgal en biorreactores. Por otro lado, una mayor intensidad lumínica proporciona una mayor cantidad de energía lumínica disponible para la fotosíntesis, lo que a su vez impulsa la captura de CO_2 y la producción de compuestos orgánicos, incluida la biomasa (Acien *et al.*, 2013). Esta relación se evidencia en el incremento en la producción de biomasa observado cuando se brindan condiciones lumínicas más favorables.

Tabla 11. Biomasa en base seca producida en condiciones de laboratorio y a la intemperie. Producción (mg mL⁻¹)

Controlado				
	<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Fase	Estéril	No Estéril	Estéril	No Estéril
Exponencial	0.100 ± 0.015	0.438 ± 0.025	0.148 ± 0.010	0.100 ± 0.012
Estacionaria	0.125 ± 0.010	0.501 ± 0.028	0.210 ± 0.013	0.204 ± 0.016
Intemperie				
	<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Fase	Estéril	No estéril	Estéril	No Estéril
Exponencial	0.652 ± 0.005	0.573 ± 0.008	0.492 ± 0.059	0.317 ± 0.031
Estacionaria	0.544 ± 0.050	0.468 ± 0.045	0.650 ± 0.040	0.345 ± 0.032

De acuerdo con la Tabla 12 donde se observan el rendimiento lipídico entre *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en condiciones controladas y a la intemperie. Se destaca la producción alta del contenido lipídico con *Chlamydomonas sp* de 0.149 ± 0.012 mg mL⁻¹ en el modelo a la intemperie en comparación con el control en agua residual no estéril, por otro lado, en el caso de *Chlorella vulgaris* la mayor producción se logró en condiciones a la intemperie en fase estacionaria con un total de 0.165 ± 0.010 mg mL⁻¹ en comparación con el control el rendimiento fue mayor.

Dentro de los factores que influyen en el contenido lipídico de las microalgas, son las condiciones de cultivo, incluyendo la luz, la disponibilidad de nutrientes y el estrés ambiental, pueden ejercer un impacto considerable en la acumulación de lípidos en las microalgas (Andreotti *et al.*, 2020). La literatura ha señalado que las condiciones estresantes, como la limitación de nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo) y la exposición a la luz solar intensa, pueden llevar a una mayor acumulación de lípidos en las

microalgas. Esto se debe a que las microalgas, en respuesta al estrés, tienden a redirigir su metabolismo hacia la acumulación de lípidos como una forma de almacenar energía para sobrevivir en condiciones desafiantes (Sugumar et al., 2020; Rashial et al., 2019).

Por otro lado, en condiciones óptimas, como las que se encuentran en control, las microalgas pueden canalizar su energía hacia el crecimiento y la reproducción en lugar de acumular lípidos en gran medida. Esto puede explicar por qué los valores más altos de contenido lipídico se observan en condiciones a la intemperie, donde las microalgas responden acumulando lípidos para enfrentar condiciones adversas (Torres et al., 2017; Caporgno et al., 2015; Morais et al., 2019).

Tabla 12. Comparación de lípidos en condiciones de laboratorio y a la intemperie. Producción (mg mL⁻¹)

Controlado				
	<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Fase	Estéril	No Estéril	Estéril	No Estéril
Exponencial	0.05 ± 0.001	0.089 ± 0.005	0.10 ± 0.006	0.08 ± 0.004
Estacionaria	0.04 ± 0.006	0.070 ± 0.006	0.11 ± 0.012	0.09 ± 0.016
Intemperie				
	<i>Chlamydomonas sp</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
Fase	Estéril	No estéril	Estéril	No Estéril
Exponencial	0.147 ± 0.012	0.148 ± 0.014	0.123 ± 0.008	0.093 ± 0.007
Estacionaria	0.149 ± 0.012	0.104 ± 0.007	0.165 ± 0.010	0.086 ± 0.008

8 CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento la mayor densidad celular alcanzada se obtuvo al realizar inóculos de 2.5×10^6 cel mL⁻¹ en efluente residual no estéril a la intemperie para *Chlorella vulgaris* con 9.44×10^6 cel mL⁻¹ y 1.34×10^7 cel mL⁻¹ y *Chlamydomonas sp* con 1.88×10^7 cel mL⁻¹ y 2.30×10^7 cel mL⁻¹ durante su fase exponencial y estacionaria. Estos tratamientos presentaron resultados de crecimiento similares al control con Medio Basal Bold en condiciones controladas de laboratorio, demostrando que se puede tener crecimiento microalgal a la intemperie, con ciclos de luz/oscuridad y temperatura natural en un efluente residual tilapia como medio de cultivo.

En cuanto al contenido de biomasa, *Chlamydomonas sp* tuvo mayor producción en el efluente no estéril al aumentar el inóculo a 2.5×10^6 cel mL⁻¹ más sin embargo el mayor contenido lipídico lo presentó *Chlorella vulgaris* bajo condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie. Si bien la biomasa y el contenido lipídico no fueron los mismos presentaron un comportamiento similar, ya que las condiciones de estrés como la fluctuación de iluminación y temperatura a la intemperie influyeron en la operación de los fotobiorreactores. La biomasa obtenida de *Chlorella vulgaris* presentó porcentajes de contenido lipídico más altos en comparación con *Chlamydomonas sp*. Por lo que se recomienda realizar estudios de cromatografía de gases para identificar si el porcentaje de lípidos es ideal para la obtención de biodiesel, bioetanol o suplementos alimenticios entre otros por su contenido de ácidos grasos.

Aunque los valores en el rendimiento de lípidos de *Chlamydomonas spp* son bajos comparado con estudios de otros autores, no se descarta el posible uso del cultivo de estas dos especies en efluente residual de tilapia con algunas modificaciones en cuanto al inóculo para la obtención de una mayor cantidad de biomasa y contenido lipídico, con la finalidad de obtener biocombustible.

Se presentó una eficiencia de remoción promedio de los compuestos Nitrogenados como el Amonio, Nitrito y Nitrato, también para el Fosfato, DQO y pH existiendo variación entre los tratamientos, entre las cepas de microalgas y en el efluente residual de manera estéril y no estéril, en las condiciones controladas de laboratorio y a la intemperie. Las remociones más bajas se presentaron en el laboratorio en los efluentes no estériles con 4.62 % de

remoción de DQO con *Chlorella vulgaris*, y para los compuestos nitrogenados el comportamiento de remoción fue similar para *Chlorella vulgaris* como para *Chlamydomonas sp* en el efluente residual de manera estéril y no estéril. Considerando que la mayor remoción de nutrientes el efluente sucede en los primeros 6 días de su empleo como medio de cultivo, las concentraciones de Amonio, Nitrito, Nitrato, Fosfato, DQO y pH luego de los 9 días incrementan y superan el límite permitido en la NOM-001-SEMARNAT-2021, en el caso de su implementación a la intemperie sucede lo contrario, ya que las remociones suceden desde el tercer día y continúan así el resto de los días de operación con excepción de los fosfatos que en ambas cepas de microalgas en el efluente residual de manera estéril y no estéril presentan incrementos en los últimos días de operación a la intemperie. Esto apunta a la posibilidad de utilizar las microalgas para este fin con un menor tiempo de cultivo.

En condiciones de laboratorio se remueven los Fosfato y pH, sin embargo el DQO no muestra remoción, sin embargo, a la intemperie las microalgas lograron la remoción de compuestos nitrogenado, permitiendo cumplir con un efluente de calidad de salida bajo la normatividad aplicable; por lo que la hipótesis es parcialmente aceptada debido a que no se logró la remediación de residual de tilapia como se esperaba; ya que se logró la generación de biomasa microalgal con *Chlamydomonas sp* y *Chlorella vulgaris* en el agua residual de tilapia a la intemperie con efluente estéril y no estéril, es de importancia la búsqueda de la remoción de los tres parámetros importantes para poder estar dentro de la normativa aplicable en materia de descargas de aguas residuales acuícolas a cuerpos de aguas nacionales (NOM-001-SEMARNAT-2021).

9 REFERENCIAS

- Acién, F., Fernández, J. & Molina, E. 2013. Photobioreactors for the production of microalgae. *Environmental science and biotechnology*. 12(2). 131:151.
- Almarashi, J., El-Zohary, S., Ellabban, M., Abomohra, A. 2019. Enhancement of lipid production and energy recovery from the green microalga *Chlorella vulgaris* by inoculum pretreatment with low-dose cold atmospheric pressure plasma (CAPP). *Energy Conversion and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112314>.
- Andreotti, V., Solimeno, A., Rossi, S., Ficara, E., Marazzi, F., Mezzanotte, V., & García, J. 2020. Bioremediation of aquaculture wastewater with the microalgae *Tetraselmis suecica*: Semi-continuous experiments, simulation and photo-respirometric tests. *Science of the Total Environment*. 738 (2020). 139:151.
- Ansari, F., Nasr, M., Guldhe, A., Kumar, S., Rawat, I., & Bux, F. 2019. Techno-economic feasibility of algal aquaculture via fish and biodiesel production pathways: A commercial-scale application. *Science of the Total Environment*. 10. 135:182.
- Apandi, N., mohamed, R. M. S.R., Al-Gheethi, A., Gani, P., Ibrahim, A. & Kassim, A.H.M. 2018. *Scenedesmus* biomass productivity and nutrient removal from wet market wastewater, Abiokinetic study. *Waste and Biomass valorization*.
- Arias, M., & Martínez, A., & Cañizares, R. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*. 18(1).43-68.
- Arumugan, K., Ahmad, M., Yaacob, N., Ikram, W., Maniyam, M., Abdullah, H., Katayama, T., Komatsu, K., & Kuwahara, V. 2020. Enhancement of targeted microalgae species growth using aquaculture sludge extracts. *Heliyon*. 6. 405:413.
- Astocondor, M., Mayta, E., Montoya, H., & Tarazona, R. 2017. Crecimiento poblacional y productividad de la microalga nativa *Chlorella peruviana* bajo condiciones de diferentes salinidades. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 28. 976:986.
- Ban, S., Lin, W., Wu, F., & Luo, J. 2017. Algal-bacterial cooperation improves algal photolysis-mediated hydrogen production. *Bioresource technology*. 251. 350-357.
- Barraza, R., Martínez, L., Enríquez, F., Martínez, M., Miranda, A., & Porchas, M. 2014. Efecto de efluentes de granjas camaronícolas sobre parámetros de la calidad del agua y del sedimento frente a la costa de Sonora, México. *Ciencias marinas*. 40(4). 221-235.
- Beltran, J., Guajardo, C., Barceló, I., López, U. 2017. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: efecto del pH nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de Biología marina y oceanografía*. Vol. 52. 3: 417:427.

- Bindra, S. & Kulshrestha, S. 2019. Converting waste to energy: Production and characterization of biodiesel from *Chlorella pyrenoidosa* grown in a medium designed from waste. *Renewable Energy*. 142. 415:425.
- Blair, M., Kokabian, B., & Gude, V. 2013. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of environmental chemical engineering*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>.
- Boffill, Y., García, A., & Castellanos, J. 2012. Estimación cuantitativa preliminar de índices de producción de biomasa microalgal a partir de la reacción de fotosíntesis. *Bioresource Technology*. 3. 31:41.
- Cabello, J., Toledo, L., Sánchez, L., Revah, S. & Morales, M. 2015. Effect of the temperatura, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource technology*, 181. 128:135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>.
- Caporgno, M.P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. 2015. Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*. 10 (2015). 232:239.
- Carneiro, M., Cicchi, B., Maia, I.B., Pereira, H., Chini Zittelli, G., Varela, J. & Malcata, X.F. 2020. Effect of temperatura on growth on growth photosynthesis and biochemical composition of *Nannochloropsis oceanic* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Algal research*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101923>.
- FAO. (2015). *FAO.ORG*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of United Nations: <http://www.fao.org/3/x5743s/x5743s0c.html>
- Feng, Y. 2020. Effects of different nitrogen sources and lighte paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella sp*-GN1 outdoors. *Bioresource technology*. 301. 122762.
- Ferrer-Álvarez, Y. I., Ortega-Clemente, L. A., Pérez-Legaspi, I. A., Hernández-Vergara, M. P., Robledo-Narváez, P. N., Ríos-Leal E. & Poggi-Varaldo. H. M. 2015. Growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloris oculata* in effluents of Tilapia farming for the production of fatty acids with potential in biofuels. *African Journal of Biotechnology*. 14(20). 1710:1717.
- Gao, F., Li, C., Yang, Z-H., Zeng, G-M., Feng, L-J., Liu, J-Z., Liu, M. & Cai, H-W. 2016. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological engineering*. 92. 55-61.

- Gonçalves, R., Assis, T., Maciel, G., Borges, R., & Alves C. 2020. Co-digestion of municipal wastewater and microalgae biomass in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Algal research*. 52. 102-112
- Guimarães, L., Hartwig, J., Bomfim, B., França, P., Vieira, J., Druzian, J., & Chinalia, F. 2020. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: High biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. *Aquaculture*. 525. 262-272.
- Guo, Z., Liu, Y., Guo, H., Yan, S., & Mu, J. 2013. Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of environmental sciences*. 25. 585-588.
- Halfhide, T., Åkerstrøm, A., Lekang, O. I., Gislerød, H. R., & Ergas, S. J. 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Research*. 6. 152-159.
- Halim, R., Michael, D., Paul, K. & Webley A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnol. Adv.* 30. 709-732.
- Harrison, P.J. & Hurd, C.L. 2001. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts of aquaculture. *Cahiers de biologie Marine*. 42. 71-82.
- Hasan, M., Khalekvzzaman, M., & Hossain, N. 2021. Anaerobic digested effluent phycoremediation by microalgae co-culture and harvesting by *Moringa oleífera* as natural coagulant. *Journal of cleaner production*. 292. 126042.
- He, Q., Yang, H., & Hu, C. 2016. Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. *Bioresource technology*. 218. 571-579.
- He, Y., Zhang, B., Guo, S., Guo, Z., Chen, B., & Wang, M. 2020. Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: Novel integrated processes from cultivation to enzyme-assisted extraction and ethanolysis of lipids. *Energy Conversion and Management*. 209 (2020). 112:122.
- Hernández-Ramírez, M. 2017. Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la remoción de nutrientes en agua de invernaderos. [Tesis de maestría, Universidad autónoma de Querétaro, Facultad de ingeniería. Querétaro, México].
- Hernández-Perez, A. & Labbé, J. 2014. Microalgas, cultivos y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. 49(2). 157:173.
- Kumar, N., Banerjee, C. & Jagadevan, S. 2021. Identification, characterization, and lipid profiling of microalgae *Scenedesmus* sp. NC1, isolated from coal mine effluent with potential for biofuel production. *Biotechnology Reports*. 30.
- Kuo, C.M., Jian, J.F., Lin, T.H., Chang, Y. B., Wan, X.H., Lai, J.T., Chang, J.S., & Lin, C.S. 2016. Simultaneous microalgal biomass production and CO₂fixation by

- cultivating *Chlorella sp.* GD with aquaculture wastewater and boiler flue gas. *Bioresource Technology*. 221. 241-250.
- Lu, W., Wang, Z., Wang, X. & Yuan, Z. 2015. Cultivation of *Chlorella sp.* using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. *Bioresource technology*. 192.382-388.
- Martínez, L. & Martínez, M. 2012. World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*. ID 389623. Pag. 9.
- Medina, O., Medina, E., Medina, J., Manrique, P., Macedo, P., & Villanueva-Salas, J. 2019. Desempeño de la Biomasa Microalgal para la microproducción de Biodiesel a partir de una brecha de potencial energético. *Véritas*. 20. 83:88.
- Morais, K., Conceição, D., Vargas, J., Mitchell, D., Mariano, A., Ordóñez, J., Galliterasawa, L., Kava, V. 2019. Enhanced microalgae biomass and lipid output for increased biodiesel productivity. *Renewable Energy*. 163. 138-145.
- Ortiz-Villota, M.T., Romero, M.A. & Meza, L.D. 2018. La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista de investigación desarrollo e innovación*. 9. 163-176.
- Pandit, R. P., & Fulekar, M. 2019. Biodiesel production from microalgal biomass using CaO catalyst synthesized from natural waste material. *Renewable Energy*. 136. 837:845.
- Park, J., Craggs, R. & Shilton, A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*. 102: 35-42.
- Pérez García, R. O. 2009. Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-Bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. [Tesis de maestría, Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C., La Paz, Baja California Sur, México].
- Petraglia, P. G., Dantas, C., Pereira, V., Nonato, N., Abrahán, R., Hégaret, H., Sassi, C. F. & Sassi, R. 2018. Effectiveness of nutrient removal and cell physiology of *Amphora sp.* cultured in shrimp farm effluents. *Environmental Science and pollution research*. 25(18). 17920-17926.
- Ranglová, K., Lakatos, G.E., Câmara Manoel, J.A., Grivalský, Suarez Estrella, F., Acien Fernández, F.G., Molnár, Z., Ördög, V. & Masojídek, J. 2020. Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella p.* strain cultivated outdoors in organic medium and wastewater. *Algal Research*. 64. 603–614.

- Rashid, N., Ryu, A.J., Jeong, K.J., Lee, B. & Chang, Y.K. 2019. Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*. 196. 640:648.
- Rodríguez, P. & Cifuentes, M. 2020. Análisis de la remoción de Amonio (NH₄) y Fosfatos (PO₄) por una cepa de microalga filamentosa dispuesta en un biorreactor rotacional de biopelícula fija. [Tesis de licenciatura, Universidad distrital Francisco José de Caldas, Bogotá].
- Runcie, J. W., Ritchie, R.J., & Larkum, W.D. 2004. Uptake kinetics and assimilation of phosphorus by *Catenella nipae* and *ulva rigida* can be used to indicate ambientphosphate availability. *Journal of Applied phycology*. 16. 181-194.
- Saavedra, M. 2006. Manejo del cultivo de Tilapia. Coordinación de Acuicultura, Departamento de Ciencias Ambientales y Agrarias, Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua.
- Sugumar, S., Rajesh, R., Kannan, P., & Venkatesan, P. 2020. Biodiesel production from the biomass of *Dunaliella salina* green microalgae using organic solvent. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.652>.
- Tejido, Y., Aymerich, E., Sancho, L., & Refardt, D. 2020. Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory and pilot-scale. *Algal Research*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101940>.
- Torres, S., Acien, G., García-Cuadra, F., & Navia, R. 2017. Direct transesterification of microalgae biomass and biodiesel refining with vacuum distillation. *Algal Research*. 28. 30:38.
- Thirugnanasambantham, R., Elango, T. & Elangovan, K. 2020. *Chlorella vulgaris* sp. microalgae as a feedstock for biofuel. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.106>.
- Umamaheswari, J. & Shanktakumar, S. 2019. Phycoremediation of paddy-soaked wastewater by indigenous microalgae in open and close culture. *Journal of environmental management*. 243. 435-443.
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., & Vervaeren, H. 2014. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: from lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresource technology*. 159.342-354.
- Viegas, C., Gouveia, L. & Gonçalves, M. 2021. Aquaculture wastewater treatment through microalgal. Biomass potential applications on animal feed, agricultura, and energy. *Journal of Environmental Management*. 286. 112187.

- Villar-Navarro, E., Ruiz, J., Garrido-Pérez, C. & Perales, J.A. 2022. Microalgae biotechnology for simultaneous water treatment and feed ingredient production in aquaculture. *Journal of water process engineering*. 49. 103115.
- Viveros-Santafe, J. 2014. Evaluación de las aguas residuales domésticas de la universidad autónoma de occidente como medio de cultivo natural para la microalga nativa *Chlorella sp.* y simultáneamente su capacidad para remover nitrato y DQO de dichas aguas. [Tesis de licenciatura, Universidad autónoma de occidente, Facultad de ingeniería, Departamento de energética y mecánica. Santiago de Cali, Colombia].
- Wang, W., Han, F., Li, Y., Wu, Y., Wang, J., Pan, R., & Shen, G. 2014. Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. *Bioresource technology*. 170. 395-403.
- Wood, A., Everroad, R., & Wingard, L. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R (Ed). *Algal culturing techniques*. USA. 56. 269-286.
- Yang, L., Li, H., & Wang, Q. 2019. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. *Bioresource technology*. 275. 35-43.
- Zhu, L., Li, S., Hu, T., Nugroho, Y. K., Yin, Z., Hu, D., Chu, R., Mo, F., Liu, C. & Hiltunen, E. 2019. Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono- and mix-cultured microalgae. *Energy conversion and management*. 201. 112:144.

10 ANEXOS

Se realizó estancia de investigación para capacitación en el uso, manejo de técnicas y material de laboratorio, como parte de la capacitación se hicieron actividades de apoyo a la MC. Flor Virginia Pérez Barradas, estudiante de doctorado bajo la tutoría del Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente, las actividades fueron: activación, producción, caracterización del inoculo de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*, producción de biomasa a mediana escala utilizando como medio de cultivo Medio Basal Bold, en el laboratorio de biotecnología de microalgas y bioenergías en el Instituto tecnológico de Boca del río.

10.1 Activación del inoculo

La activación de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* (Figura 43) en matraces de 500 mL y 1 L respectivamente, ambas cepas se conservan en refrigeración, se realizó conteo para determinar el inoculo para el nuevo medio a volumen mayor, para la propagación, empleando una campana de flujo laminar previamente esterilizada con luz UV durante 15 minutos, se inocularon los matraces con medio basal Bold con una alícuota de 10 mL de cada cepa (*Chlorella vulgaris* y *N. oculata*). Cada matraz cuenta con un sistema de aireación continua que consiste en tapón de goma #8 previamente perforado para introducir los tubos, se incuban con intensidad de luz continua con lámparas de luz blanca (Figura 44) a $79.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Álvarez *et al*, 2015), temperatura de 20 °C.



Figura 43. Activación de *Chlorella vulgaris* y *N. oculata*.



Figura 44. Incubación *Chlorella vulgaris* y *N. oculata*.

10.2 Conteo celular

Se realizó con la cámara de Neubauer Figura 45, consistió en tomar una pequeña muestra con la micropipeta, se colocó en el borde del cubreobjetos, en los extremos de la cámara de Neubauer, colocándola en la bandeja del microscopio y sujeta con la pinza de sujeción, enfocando el microscopio, observando las células más nítidas, en los 5 cuadrantes, el número de células se calculó mediante la concentración de cel mL⁻¹ dada por la siguiente ecuación:

Ecuación 6

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{númerodecélulas}}{\text{volumen(enmL)}} * 10000$$

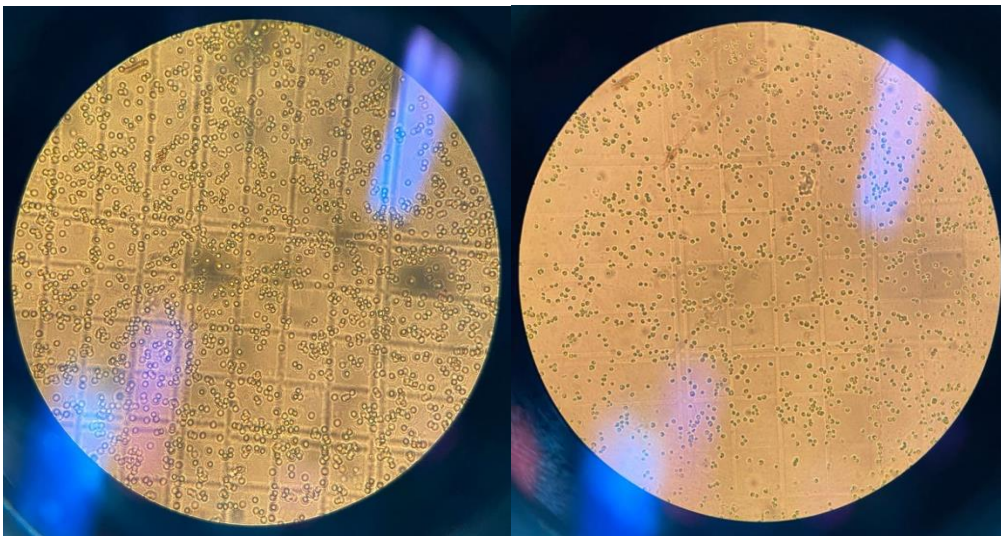


Figura 45. Microalga *N. oculata* y *Chlorella vulgaris*

10.3 Producción del inoculo

Después de la activación de la cepa, durante 2 semanas de crecimiento, se continuó realizando el conteo celular durante los días 0, 1, 6 y 7 durante la fase exponencial, hasta obtener una densidad celular de 25 X 10⁶ cel mL⁻¹ para *N. oculata* y 7.5 X10⁶ cel mL⁻¹ para *Chlorella vulgaris*. En las Figura 46 y Figura 47 muestra la cinética de crecimiento para *Chlorella vulgaris* y *N. oculata* respectivamente.

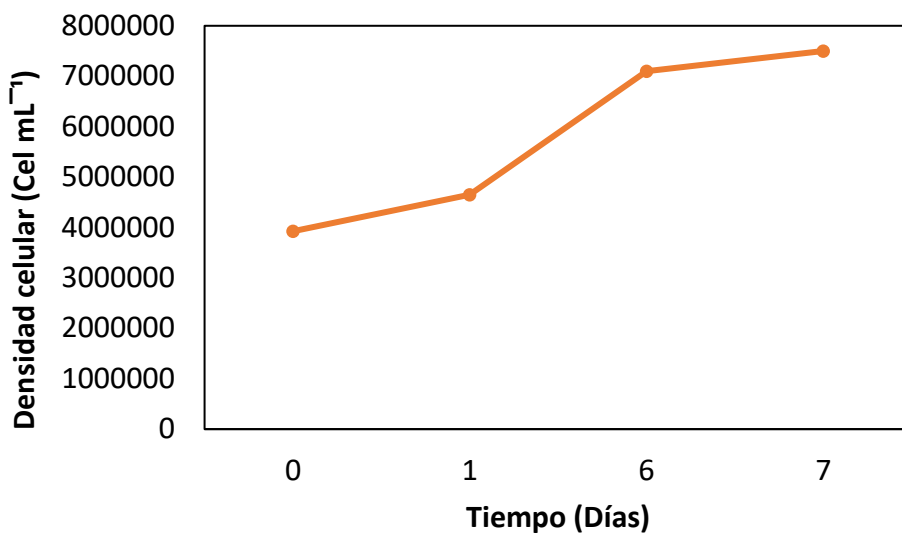


Figura 46. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

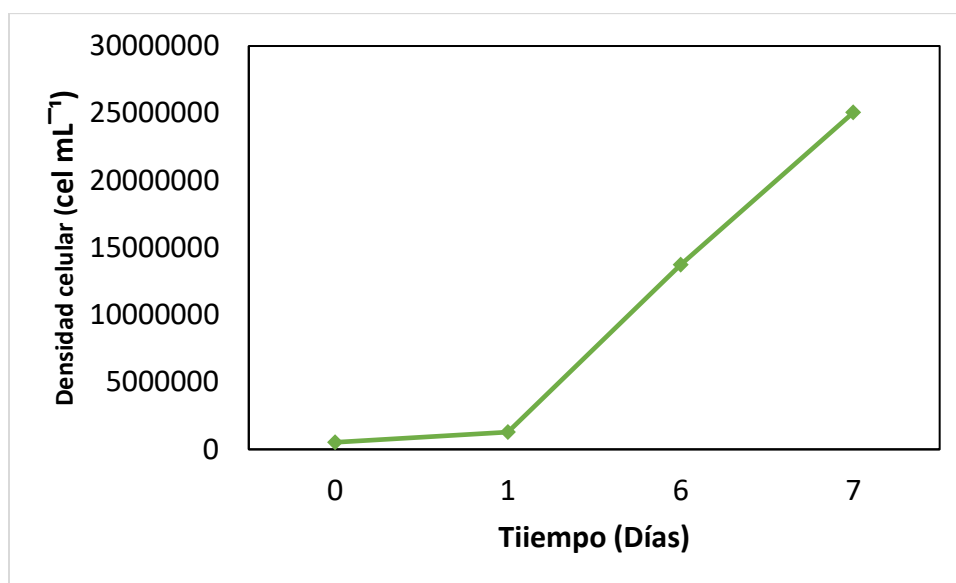


Figura 47. Cinética de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*.

10.4 Producción escalada de biomasa

Se realizó escalamiento a 20 L (Figura 48), con una alícuota de 218.56 mL del inóculo de *Chlorella vulgaris*, y 718 mL del inóculo de *N. oculata*, calculada mediante la Ecuación 12, vertiendo está en agua de la llave que previamente fue sanitizada con cloro y posteriormente neutralizada con Tiosulfato, se añadieron nutrientes, una ampollita que contenía hidroxocobalamina, tiamina, piridoxina, también una ampollita con nitrógeno total, fósforo, potasio, azufre, boro, cobalto, zinc, cobre, molibdato, calcio, magnesio,

hierro, manganeso, clorhidrato de tiamina y ácido indolacético, sellándolos con un tapón de goma #8 que previamente se perforo para introducir, un tubo de vidrio con sistema de aireación continua, se incubaron con intensidad de luz continua con lámparas de luz blanca (Figura 47) a $79.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Álvarez *et al.*, 2015), a una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ecuación 2

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2} = \frac{((1 \times 10^6)(\text{Voldeoperación}))}{\left(\text{conc} \frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right)}$$



Figura 48. Incubación escalada en biorreactores de 20 L

10.5 Producción de biomasa a mediana escala

El escalamiento a 200 L, con una alícuota de 20 L del inoculo de *Chlorella vulgaris*, y 20 L del inoculo de *N. oculata*, vertiendo en agua de la llave previamente sanitizada con cloro y posteriormente neutralizada tiosulfato, se añadió como nutrientes una ampollita que contenía hidroxocobalamina, tiamina, piridoxina, también una ampollita con nitrógeno total, fósforo, potasio, azufre, boro, cobalto, zinc, cobre, molibdato, calcio, magnesio, hierro, manganeso, clorhidrato de tiamina y ácido indolacético, sellando con plástico de grado alimenticio, introduciendo un difusor de burbujas conectado a una manguera con sistema de aireación continua, se incubaron con iluminación continua (Figura 49) a $55.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Álvarez *et al.*, 2015), a una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figura 49. Incubación escalada en biorreactores de 200 L.

10.6 Cosecha de la biomasa producida

Posteriormente 7 días durante la fase exponencial de los biorreactores de 200 L, se floclulo con carbonato de sodio y sulfato de aluminio, al obtener la biomasa producida en esta fase, se almaceno en recipientes de 20 litros (Figura 50) para continuar su floclulación y así obtener la mayor cantidad de biomasa concentrada.



Figura 50. Cosecha y almacenamiento de la biomasa en recipientes de menor volumen.

Posterior a su almacenamiento en los recipientes de 20 L, se floclulo nuevamente para retirar el exceso de agua y obtener una concentración aproximada de 4 L de biomasa, y nuevamente ser almacenada en recipientes de 5 L para continuar su floclulación y caracterización Figura 51.



Figura 51. Almacenamiento de la biomasa cosechada en recipientes de menor volumen

10.7 Determinación de Nitrógeno Total Kjeldahl NKT (mg/L)

- A. El nitrógeno de las muestras se dirige con ácido sulfúrico caliente más una gente catalítica que favorece la reacción convirtiendo todo el nitrógeno orgánico e inorgánico a nitrógeno amoniacal. El amoniaco se libera al agregar un álcali y destilar la muestra por arrastre de vapor en ácido bórico; con el cual forma los iones amonio y borato. La titulación se efectúa con ácido clorhídrico en forma indirecta proporciona el contenido de nitrógeno.
- B. Interferencias: la presencia de nitratos o nitritos puede ser fuente de errores tanto positivos como negativos. Los nitratos o nitritos pueden reducirse en las condiciones del análisis del amoniaco, originándose resultados erróneamente altos. Estas sales también pueden descomponerse a la temperatura de mineralización dando como resultado una pérdida de nitrógeno en forma gaseosa y, por tanto, resultados erróneamente bajos. Materia orgánica, durante la digestión, el H_2SO_4

oxida la materia orgánica a CO_2 y H_2O . en presencia de una gran cantidad de materia orgánica, se consume mucho ácido, aumentar la proporción de sal-ácido y aumentar la temperatura de digestión.

1. Instrumental

Unidad de digestión microkjeldahl

2. Reactivos

- a. Ácido sulfúrico concentrado.
- b. Catalizador ($\text{HgO-K}_2\text{SO}_4$). - Pesar 50 g de sulfato de potasio adicionar, 2 g de óxido de mercurio y mezclar hasta obtener un polvo completamente homogéneo.
- c. Solución de NaOH 60 %- $\text{Na}_2\text{SO}_2\text{O}_3$ 5 %. Disolver completamente 600 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 600 mL de agua destilada, enseguida disolver 50 g de tiosulfato de sodio y aforar a 1000 mL.
- d. H_3BO_3 5 % (P/V). Pesar 50 g de ácido bórico disolverlos en agua destilada y aforar a 1000 mL.
- e. HCl 0.01 N.- 1 mL de ácido clorhídrico de 37.5 % de pureza, diluirlo en agua destilada y aforar a 1000 mL. Normalizar con borato de sodio utilizando rojo de metilo como indicador.
- f. Rojo de metilo 0.2 % (P/V). - Disolver 200 mg de rojo de metilo en etanol absoluto y aforar a 100 mL.
- g. Azul de metilo 0.2 % (P/V). - Pesar 100 mg de azul de metileno y diluir en 50 ml de etanol absoluto.
- h. Solución indicadora (rojo de metilo-azul de metileno). - Mezclar 100 ml de solución alcohólica de rojo de metilo 0.2 % con 50 mL de azul de metileno 0.2 %.

3. Procedimiento.

Pesar de 15-40 mg de muestra en un matraz microkjeldahl, adicionando 1 g de mezcla catalizadora y 2.5 ml de ácido sulfúrico, se pone a digerir la muestra en el equipo de digestión con extractor de vapores, hasta que clarifique manteniendo el calentamiento de 1.5 – 2 horas y dejar enfriar. El residuo se disuelve en poca cantidad de agua destilada y transferir al tubo del destilador lavando el matraz de 2-3 veces con agua destilada.

En un matraz Erlenmeyer se colocan 5 mL de la solución de ácido bórico al 5 % con 2 gotas de indicador en la terminal del condensador, cuidando que esta quede dentro de la solución. El tubo con muestra se coloca en el destilador y se adicionan 10 mL de solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio. Se inicia la destilación por arrastre de vapor, colectando aproximadamente de 75-100 mL de destilado. Esta solución se titula con ácido clorhídrico 0.01 N hasta que vire el color del indicador de verde a violeta.

Para cada determinación se utiliza un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

4. Cálculos

Ecuación 7

$$\%N = ((V2 - V1) * (eqN) * (N) * 100) / M$$

Dónde:

%N= Porcentaje de nitrógeno total

V1= Volumen de HCl gastado en titular el blanco (mL)

V2= Volumen de HCl gastado en titular la muestra (mL)

eqN= 14.007

N= Normalidad de HCl (0.01 N)

M= peso de la muestra (mg)

5. Bibliografía

A.O.A.C. 14.003.1984. Official methods of analysis. 14th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. U.S.A.

10.8 Técnica para determinar DQO

1. Introducción

Este método determina la cantidad necesaria de oxígeno necesario para oxidar materia orgánica presente contenida en una muestra de agua bajo condiciones específicas de un agente oxidante en condiciones acidas, transformándolas en bióxido de carbono y agua, sin importar si es o no asimilable biológicamente.

Este método consiste en someter una muestra a reflujo con H₂SO₄ concentrado y K₂Cr₂O₇ valorado; durante el periodo de reflujo la materia oxidable reduce una cantidad equivalente

de dicromato al oxígeno consumido. El remanente es valorado con una solución de Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ de concentración conocida.

2. Preparación de reactivos

Preparación de la solución oxidante 0.25 N

1. Se secan aproximadamente 15 g de K₂Cr₂O₇ en la estufa a 105 °C durante 2 horas, después se deja enfriar en un desecador.
2. Se pesa exactamente en la balanza analítica 12.259 g.
3. En 500 mL de agua destilada se disuelve el K₂Cr₂O₇ pesado y se afora a un volumen de 1 L con agua destilada.

Nota: Agregar 33.3 mL de H₂SO₄ concentrado para aguas que presenten cloro en el siguiente intervalo de concentraciones 200-500 mg L⁻¹.

4. Solución catalizadora

Preparación de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA) 0.05 N

1. A un litro de H₂SO₄ concentrado agregar 11 g de Ag₂SO₄ y dejar reposar 1 o 2 días hasta que se disuelva. Por razones de costo puede prescindirse de Ag₂SO₄.
2. Preparación de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA) 0.05 N
3. Pesar 19.6 g de SFA: 6H₂O, y disolver en 500 mL de agua destilada, agregar lentamente 20 mL de H₂SO₄ concentrado, enfriar y aforar a un litro con agua destilada.
4. El SFA se valora colocando en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 2.5 mL de agua destilada, 1.5 mL de K₂Cr₂O₇ y 3 mL de H₂SO₄ concentrado, 1 gota de fenantrolina y agregar SFA hasta observar cambio de color.
5. Aplicando la siguiente fórmula se determina la normalidad del SFA.

Ecuación 8

$$NSFA = (V_{K_2Cr_2O_7} [1.5 \text{ mL}]) (N_{K_2Cr_2O_7}) / VSFA$$

Dónde:

V K₂Cr₂O₇ = Volumen de K₂Cr₂O₇ (mL)

N K₂Cr₂O₇ = Normalidad del K₂Cr₂O₇

VSFA = Volumen gastado de SFA (mL)

Indicador 1-10-fenantrolina monohidratada

- 1) Se pesa 1.485 g de 1-10-fenantrolina monohidratada
- 2) Se pesan 0.695 g de sulfato ferrosoheptahidratado
- 3) Se disuelven las sustancias pesadas anteriormente en agua destilada en un matraz aforado de 100.

6. Procedimiento

Si no se conoce el rango de la DQO de la muestra se debe de recorrer un tren de diluciones la muestra para ubicar el valor de DQO O bien basarse en datos bibliográficos.

1. Marcar el nivel al que llega un volumen de 7.5 mL en los tubos especiales para determinar DQO micro.
2. Poner en cada tubo 2.5 mL de muestra y 1.5 mL de solución oxidante ($K_2Cr_2O_7$) y 3.5 mL de solución catalizadora (H_2SO_4 concentrado).
3. Preparar un blanco igual que el punto 2 substituyendo los 2.5 mL de muestra por agua destilada.
4. Agregar 3 perlas de ebullición a cada tubo.
5. Agitar la mezcla antes de calentar para prevenir proyecciones por el calentamiento local del fondo del tubo, y colocar el condensador en la boca del tubo.
6. Poner a reflujo entre 200 y 250 °C durante 2 horas.
7. Dejar enfriar, si se evapora un volumen considerable del líquido reponerlo con agua destilada hasta la marca de 7.5 mL.
8. Transferir el contenido del tubo para DQO a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, agregar una gota de indicador fenantrolina y titular usando la solución de SFA. El vire del indicador en el punto final es de azul verdoso a café rojizo.
9. Para determinar la DQO se aplica la siguiente formula:

Dónde:

Ecuación 9

$$DQO = (A - B) (N) (8000) / (V)(FD)$$

A= mL de SFA gastados en el blanco

B= mL de SFA gastados en la muestra

N= normalidad el SFA

FD= factor de dilución

V= volumen de la muestra

10.9 Técnica para determinación de sólidos

1. Discusión general.

Los sólidos totales incluyen los sólidos en suspensión y en disolución. Los sólidos volátiles se determinan tras la ignición de la muestra; este no sólo provoca pérdidas en materia orgánica, sino que también se descomponen o volatizan sales minerales.

2. Instrumental

- a. Cápsulas de porcelana
- b. Estufa a 105 °C
- c. Mufla a 550 °C
- d. Desecador

3. Procedimiento

a. Sólidos totales (ST)

Pesar una capsula de porcelana previamente mantenerla en la estufa a peso constante (C), tomar (10 mg) de muestra y poner en la cápsula, se deja secar hasta tener un peso constante a 103 – 105 °C (o bien a 550 °C por 5 horas), pasar a un desecador, enfriar y pesar, calcular el peso de los sólidos contenidos en la muestra por diferencia entre el peso de la capsula al sacarla de la estufa y el peso que tenía vacía (CE-C).

b. Sólidos Volátiles (SV)

Llevar la capsula donde se determinaron los sólidos totales a la mufla (550 °C) durante dos horas, sacar a un desecador y dejar enfriar y posteriormente pesar (CM), calcular por diferencia el peso de los sólidos volátiles contenidos en la muestra (CE-CM).

Ecuación 10

$$SV=CE-CM$$

c. Referencia

NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua, determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales tratadas-Método de prueba

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the examination of Waste and Wastewater. 13th Edición 1971.

10.10 Humedad

Para llevar a cabo determinaciones gravimétricas de humedad se emplea la técnica de peso constante. La cual permite conocer cuando una muestra a perdido por completo o casi por completo su humedad.

Procedimiento

1. Pesar la muestra o material (crisol, capsula, vidrio de reloj, matraz, materia orgánica, etc.). Registrar el peso.
2. Encender la estufa a 60 °C.
3. Colocar en la estufa la muestra o el material y dejarlo ahí durante 24 horas.
4. A las 24 horas sacarlo colocarlo en un desecador para que se enfríe y pesarlo cuando este a temperatura ambiente, registrar el peso.
5. Volver a meter la muestra o el material durante una hora.
6. Repetir el paso 4 (si la muestra o material da el mismo peso entonces está a peso constante) si el peso vario al anterior se repite el paso 5 y posterior el 4 hasta que tres pesos sean constantes.
7. Se mantiene en el desecador hasta su uso.

Participación en congreso

