



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias Ingeniería en Biosistemas

“Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la
remoción de nutrientes en agua de invernaderos.”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de
Maestría en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Miriam Rebeca Hernández Ramírez

Dirigido por:

Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo

Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Secretario

Firma

M. en B. Mónica Rodríguez Palacio

Vocal

Firma

Dr. Juan Manuel Vera Morales

Suplente

Firma

Dr. Enrique Rico García

Suplente

Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no habría sido posible sin el apoyo de mi familia, amigos y asesores. Por ello, quiero extender mi agradecimiento especial a mis padres, hermanos y a David, quienes me dieron la fuerza de seguir adelante en los momentos difíciles.

También agradezco a Marieke Vanthoor-Koopmans pues gracias a ella crecí no sólo profesional sino personalmente. Gracias por introducirme en esta área de la ciencia y por ayudarme a abrir caminos que sola no habría sabido hacer.

Gracias a Mónica Rodríguez Palacio por estar siempre atenta de mi avance a lo largo de la maestría, a pesar de la distancia, y por enseñarme las bases del trabajo con microalgas.

A Alejandro Cruz Mendoza mi especial agradecimiento por ser un sostén en los últimos tres años, por escucharme, apoyarme y sentir este camino también tuyo.

Por último, a Diana Sáenz de la O, quien fue mi amiga y compañera incondicional a lo largo de estos dos años de maestría.

A todos ustedes, ¡Gracias!

RESUMEN

Cada día la densidad poblacional va en aumento, y con ella también lo hace el uso y la contaminación de agua, sobretodo la proveniente del sector agrícola al ser una de las mayores fuentes de contaminación, pues utiliza hasta el 78% del recurso hídrico de México. Actualmente menos del 30% del efluente de cultivos es tratado antes de ser desechado, por lo que los nutrientes remanentes son descargados a ríos, lagos e incluso mantos acuíferos, generando el crecimiento descontrolado de plantas y algas que, con el paso del tiempo alteran la flora y fauna naturales. Este proceso, conocido como eutrofización, puede evitarse con tratamiento del agua adecuado para eliminar sales -como nitratos y fosfatos- antes de ser desechados al ambiente. Una de las técnicas más prometedoras de los últimos años es mediante el uso de microalgas, ya que éstas aprovechan los nutrientes contenidos en el agua para producir biomasa, misma que tiene un alto valor nutricional gracias a que contiene hasta un 50% de proteínas (incluyendo aminoácidos esenciales), vitaminas, minerales, lípidos esenciales, entre otros. Sin embargo una de las principales dificultades que presenta su cultivo es el control de la temperatura, ya que resulta costoso mantenerla en el rango óptimo. Por ello es importante trabajar con especies que tengan la capacidad de adaptarse a altas y bajas temperaturas, es decir, que la sean capaces de producir altas concentraciones de biomasa en un amplio rango de temperaturas. En este trabajo se cultivaron dos especies de microalgas: *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua de descarga de invernaderos hidropónicos a diferentes temperaturas (23, 27, 29 y 31°C), en un fotobioreactor de panel plano con capacidad de 390±10 ml, en donde se controló el fotoperiodo, la agitación, intensidad de luz y el pH. La máxima producción de biomasa en el caso de *C. vulgaris* se obtuvo en el cultivo de 31°C, con 11.5 g·L⁻¹, crecimiento específico de 1.27 d⁻¹ y remoción de fosfatos y nitratos de 118.35 y 193.10 mg·L⁻¹, respectivamente; mientras que para *Scenedesmus* sp. los valores fueron: 7.65 g·L⁻¹, crecimiento específico de 1.38 d⁻¹, remoción de fosfatos y nitratos de 58.53 y 80.77 mg·L⁻¹, respectivamente, a 23°C. Ambas especies mostraron alta producción de biomasa en las diferentes temperaturas, excepto por *Scenedesmus* sp a 35°C, ya que mostró incremento en la biomasa hasta después de 7 días de cultivo. Es posible cultivar microalgas y obtener una alta concentración de biomasa, a la vez que se reducen los nutrientes en más del 70% aún en altas temperaturas. Este trabajo es el primer paso hacia mantener cultivos semicontinuos, por lo cual, el siguiente paso es realizar estudios para evaluar el tiempo de retención hidráulica que favorezca tanto el crecimiento como la remoción de nutrientes durante un tiempo más prolongado para evaluar la influencia de las estaciones en el crecimiento de las microalgas.

SUMMARY

Population has been drastically increasing in the past years, and with it, so has been water pollution, especially from the agricultural sector since it is one of the major pollution sources, using up to 78% of the water resource in Mexico. Currently, less than 30% of the crop effluent is treated before being discharged, so the remaining nutrients are discharged into rivers, lakes and even groundwater, generating uncontrolled growth of plants and algae that, with the passage of time, alter the natural flora and fauna. This process, known as eutrophication, can be avoided by treating water to remove salts - such as nitrates and phosphates - before discharging into the environment. One of the most promising techniques in recent years is the use of microalgae, since they take advantage of the nutrients contained in the water to produce biomass, which has a high nutritional value because it contains up to 50% protein (including essential amino acids), vitamins, minerals, essential lipids, among others. However, one of the main difficulties presented by its cultivation is the control of the temperature, since it is expensive to maintain it in the optimum range. Therefore, it is important to work with species that have the capacity to adapt to high and low temperatures, that is, they can produce high concentrations of biomass over a wide range of temperatures. In this work two species of microalgae were cultivated: *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. in drainage water from hydroponic greenhouse at different temperatures (23, 27, 29 and 31°C), in a flat panel photobioreactor with a capacity of 390 ± 10 ml, where photoperiod, agitation, light intensity and pH are fully controlled. The maximum biomass production in the case of *C. vulgaris* was obtained in the culture of 31°C, with $11.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, specific growth rate (μ) of 1.27 d^{-1} and removal of phosphates and nitrates from 118.35 and 193.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; while for *Scenedesmus* sp. values were: $7.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, specific growth rate (μ) of 1.38 d^{-1} , removal of phosphates and nitrates from 58.53 and 80.77 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, at 23°C. Both species showed high biomass production at different temperatures, except for *Scenedesmus* sp at 35 ° C, as its biomass increased only after 7 days of cultivation. It is possible to grow microalgae and obtain high concentration of biomass, while reducing nutrients by more than 70% even at 35°C in the case of *C. vulgaris*. This work is the first step towards maintaining semi-continuous cultures. Next step is to perform studies to evaluate the hydraulic retention time that favors both growth and nutrient removal for a longer time.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	10
2.1 Ciclo del agua en los invernaderos hidropónicos	10
2.2 Tratamiento de agua	11
2.3 Microalgas	13
2.4 Efecto de la temperatura en los cultivos de microalgas	14
2.5 Fotobioreactores	16
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	18
• General	18
• Específicos	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Obtención de las especies	19
5.2 Establecimiento de cultivos	19
5.2.1 Agua de invernaderos	19
5.2.2 Cultivo en fotobioreactor.	19
5.2.2.1 Condiciones de cultivo	20
5.3 Cuantificación de parámetros	20
5.3.1 Concentración celular	20
5.3.2 Concentración de nutrientes	21
5.4 Cálculos de variables	22
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1 Crecimiento y remoción de nutrientes en <i>Chlorella vulgaris</i>	23
6.2 Crecimiento y remoción de nutrientes <i>Scenedesmus</i> sp.	28
VII. CONCLUSIÓN	34
VIII. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eutrofización en la zona de descarga de agua en Agropark, Colón, Querétaro	8
Figura 2. Ciclo del agua en los invernaderos del Agropark	13
Figura 3. Diferentes tipos de bioreactores para microalgas	17
Figura 4. Fotobioreactor Algaemist-S.	21
Figura 5. Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> a diferentes temperaturas	24
Figura 6. Crecimiento específico de <i>Chlorella vulgaris</i> en las diferentes temperaturas.	26
Figura 7. Remoción de nutrientes en <i>C. vulgaris</i> y máxima producción de biomasa	27
Figura 8. Relación entre concentración de nutrientes y peso seco.	28
Figura 9. Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. en peso seco densidad óptica	30
Figura 10. Crecimiento específico de <i>Scenedesmus</i> sp.	31
Figura 11. Remoción de nutrientes (nitrógeno y fosfatos) y producción de biomasa por cada temperatura.	32
Figura 12. Relación entre concentración de nutrientes y peso seco.	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de cultivo para <i>Scenedesmus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .	21
Cuadro 2. Productividad (r_x) y tiempo de duplicación (Td) de <i>C. vulgaris</i> .	29
Cuadro 3. Productividad (r_x) y tiempo de duplicación (Td) de <i>Scenedesmus</i> sp.	34

I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de cultivo hidropónicos actuales permiten la recuperación del agua excedente de los cultivos, misma que aún contiene los nutrientes que no fueron absorbidos por las plantas (Herrera 2000). Estos, al ser desechada el agua, llegan a ríos, lagos, suelo e incluso agua del subsuelo, favoreciendo el crecimiento descontrolado de plantas, musgos y algas, lo que provoca la disminución de la calidad del agua, así como la merma de la fauna natural debido al cambio de pH o al efecto de las toxinas producidas por algunas algas (Blackburn, 2013).

Para evitar o reducir este fenómeno llamado eutrofización, es fundamental tratar el agua antes de ser descargada a los ríos con el fin de evitar que el exceso de nutrientes llegue a los ecosistemas. Existen diversos tipos de tratamientos, uno de los más prometedores es mediante el uso de microorganismos que aprovechen los nutrientes para su propio crecimiento; además, es la técnica de menor costo de operación y no genera contaminaciones secundarias (Christenson & Sims 2011).



Figura 1. Eutrofización en la zona de descarga de agua en Agropark, Colón, Querétaro.

Desde hace más de 60 años se empezaron a utilizar las microalgas como tratamiento de agua residual para reducir la cantidad de nutrientes presentes en ella -especialmente nitrógeno y fósforo al ser los principales causantes de la eutrofización- ya que estas tienen la capacidad de absorber nutrientes inorgánicos e incorporarlos en su biomasa como compuestos orgánicos. Esta técnica de tratamiento se propuso debido a que las microalgas son relativamente fáciles de cultivar y requieren pocos costos de manutención. Además, es posible obtener componentes secundarios de alto valor a partir de ellas.

Las microalgas son organismos fotosintéticos, cuyo tamaño varía desde uno hasta más de 20 micrómetros (Andersen, 2013). Principalmente crecen en la superficie de cualquier

cuerpo de agua, ya que para su reproducción solamente requieren de CO₂, luz y nutrientes; contienen altos porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos; algunas de ellas tienen los aminoácidos esenciales para la producción de proteínas de las células en los seres humanos (Liu & Hu, 2013), otras especies contienen lípidos poliinsaturados (omega 3, 6 y 9) o lípidos que pueden ser utilizados para producir biodiesel. Los carbohidratos y pigmentos de ciertas microalgas, como las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* han sido empleados como coadyuvantes en el tratamiento contra células cancerígenas (Syrett et al. 1986; Baudalet et al. 2013).

Actualmente el cultivo de microalgas ha sido de gran interés a nivel mundial por el valor agregado que otorgan todos sus componentes. Por ejemplo, la empresa Earthrise, ubicada en California, Estados Unidos, es la planta más grande del mundo en cultivo de la especie *Chlorella vulgaris*, donde se cosechan más de 700 toneladas por año a partir de 185 hectáreas de cultivos abiertos (Zitelli et al., 2013). Existen varias empresas dedicadas al cultivo de otras especies de microalgas para producción y extracción de antioxidantes, pigmentos, lípidos, entre otros; por ejemplo, en Hawái, EUA, la empresa Cyanotech Co. cultiva *Haematococcus pluvialis* rica en el antioxidante astaxantina, de la cual se obtienen anualmente 300 toneladas (Carvalho et al. 2006).

Sin embargo, mantener cultivos a gran escala aun representa un reto debido a que los sistemas más económicos para realizarlo no permiten tener controladas las condiciones de cultivo, por lo que los rendimientos en producción de biomasa son bajos, además de que sólo se pueden cultivar un limitado número de especies que crezcan en medios selectivos para limitar la contaminación con otras especies (Raffaello 2010). Dichos sistemas son llamados "open ponds", los cuales consisten en estanques ovalados tipo *raceways* con no más de 30 cm de profundidad (Janssen 2002), en donde el cultivo se mantiene en movimiento mediante una hélice giratoria en uno de sus extremos para permitir que todas las células reciban la misma cantidad de luz solar. La cantidad de CO₂ suministrada no es suficiente para satisfacer las necesidades del cultivo, pues es captado directamente del ambiente y solo las células que están en la superficie tienen acceso a él (Grobelaar, 2013). Otra desventaja de estos sistemas es que existe dilución del cultivo así como de nutrientes con la lluvia (Kunjapur & Eldridge 2010).

Mayores eficiencias de crecimiento son alcanzadas cuando el cultivo se lleva a cabo en reactores cerrados que pueden ser tubulares verticales u horizontales, o paneles planos, principalmente. Estos reactores permiten mantener las condiciones de pH, temperatura e

inyección de CO₂ con menor pérdida por difusión, sobre todo, evitan que los cultivos se contaminen. No obstante, la manutención, inversión y el control de estos factores son mucho mayores que en los sistemas abiertos (Zitelli et al., 2013).

A pesar de que el tipo de reactor utilizado determina en gran medida el potencial de las microalgas para acceder a los nutrientes (luz, CO₂ y compuestos químicos), también es importante encontrar una especie que se adapte a las condiciones en las que será cultivada, sobre todo para regiones con climas extremos. Idóneamente, esta debe cumplir con las siguientes condiciones: alta tasa de crecimiento, adaptabilidad a distintas fuentes de nutrientes, tolerancia a contaminantes, alta tolerancia a la variación estacional, alto contenido en productos de valor añadido y buena capacidad para formar agregados para una cosecha de bajo costo (Hernández & Labbé 2014; Santo 2014).

En este trabajo se combina el uso de un fotobioreactor de alta tecnología para reducir la concentración de nutrientes - tales como fosfatos y nitrógeno de nitratos (N-NO₃) - en agua de descarga de invernaderos hidropónicos, a la vez de producir biomasa microalgal. Con esta técnica se disminuyen los costos de producción ya que no hay compra de nutrientes para añadirlos al medio. Así mismo, tiene efectos positivos al medio ambiente, ya que se reduce la contaminación del agua y la eutrofización en el ambiente.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Ciclo del agua en los invernaderos hidropónicos

Los cultivos hidropónicos se caracterizan por ser sistemas cerrados donde las plantas se desarrollan sobre un sustrato inerte utilizado como soporte para la raíz (arena, grava, fibra de coco, entre otros), enriquecido con una solución nutritiva, es decir, agua y fertilizantes.

Al no tener una superficie sólida que absorba el agua, la solución nutritiva excedente puede ser recuperada para después filtrarla con el fin de eliminar desechos orgánicos, como fragmentos del soporte, hojas y raíces. Posteriormente, debe ser desinfectada para eliminar organismos con potencial patógeno. Este último tratamiento puede ser químico, añadiendo cloro al agua, o físico mediante luz UV (Lara, 2000). Después de este proceso el agua puede ser recirculada hacia los cultivos, no sin antes restablecer la concentración de los nutrientes.

A pesar de que este tipo de riego cerrado da la ventaja de recircular y disminuir la cantidad de agua utilizada, cada vez que se restablece la composición química también incrementa la concentración de sodio y sulfatos, que no son absorbidos por las plantas en el mismo rango que otros nutrientes, por lo que cada vez que comienza el ciclo, la conductividad eléctrica va incrementando hasta llegar a un punto en que es desfavorable para que las plantas asimilen los nutrientes, lo que provoca una reducción en la producción. En ese momento el agua debe ser desechada (Putra & Yuliando 2015; Zekki et al. 1996).

Esta solución contiene nutrientes que no fueron absorbidos por la planta, principalmente nitrógeno y fósforo, seguida de otros macronutrientes como potasio, calcio, magnesio y sulfuro; y micronutrientes como hierro, manganeso, zinc, cobre, entre otros. Estos mismos nutrientes son los necesarios para cultivar microalgas (Somerville et al. 2014).

Cuando esta solución nutritiva es desechada al suelo o canales de descarga, la concentración de nutrientes, más la radiación solar favorecen el crecimiento descontrolado de plantas, fitoplancton, algas y musgos. Esto puede ser perjudicial para los ecosistemas pues agotan el oxígeno presente, consumen el agua e incluso pueden generar daños físicos a la fauna, como exudados en las branquias de los peces. Algunas algas producen compuestos tóxicos para muchas especies acuáticas, lo que ocasiona efectos desfavorables para la cadena trófica, afectando incluso a los seres humanos. Este efecto es conocido como eutrofización (Blackburn, 2013).

Existe el riesgo de que la eutrofización llegue a los mantos acuíferos, pues como consecuencia se reduce la cantidad de agua contenida en ellos. Esto puede provocar un problema severo sobre todo en zonas donde existen cultivos protegidos, como el caso de estudio de este proyecto, ya que el agua utilizada para irrigar las plantas es extraída directamente del subsuelo. Tratar el agua antes de ser descargada ayudaría a evitar o reducir en gran medida su contaminación.

Este estudio se realizó con agua de descarga de invernaderos hidropónicos localizados en la región de Colón, Querétaro, México, en el clúster "Agropark" (20.692017, -100.010800). Este conjunto de empresas tiene más de 100 hectáreas productivas, las cuales generan 2.3 millones de litros de agua descargada al año. El monitoreo de datos entre 1986 y 2013 demuestran que el nivel del agua subterránea ha disminuido en 0.7 m por año, es decir, en los últimos 20 a 30 años, el nivel del agua cayó de 14 a 21 metros. Si esto continúa así, puede llegar a agotar la fuente de agua, deteriorar la calidad del suelo y con ello, afectar a las poblaciones aledañas (Aqua-Terra-Nova 2015). La figura 2 representa el ciclo que sigue el agua para este caso en particular.

2.2 Tratamiento de agua

El principal objetivo del tratamiento de agua es la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la cual indica la capacidad de los microorganismos para oxidar la materia orgánica a CO_2 y agua, utilizando el oxígeno como agente oxidante. Sin embargo, debido a que el agua utilizada para riego en los cultivos hidropónicos no contiene altas cantidades de materia orgánica, la DBO suele tener bajos valores. Por consiguiente, el tratamiento químico o microbiológico de esta agua no es muy frecuente, pero sí necesario para eliminar el exceso de nutrientes que son descargados y así evitar el problema de eutrofización (Abdel et al. 2012)

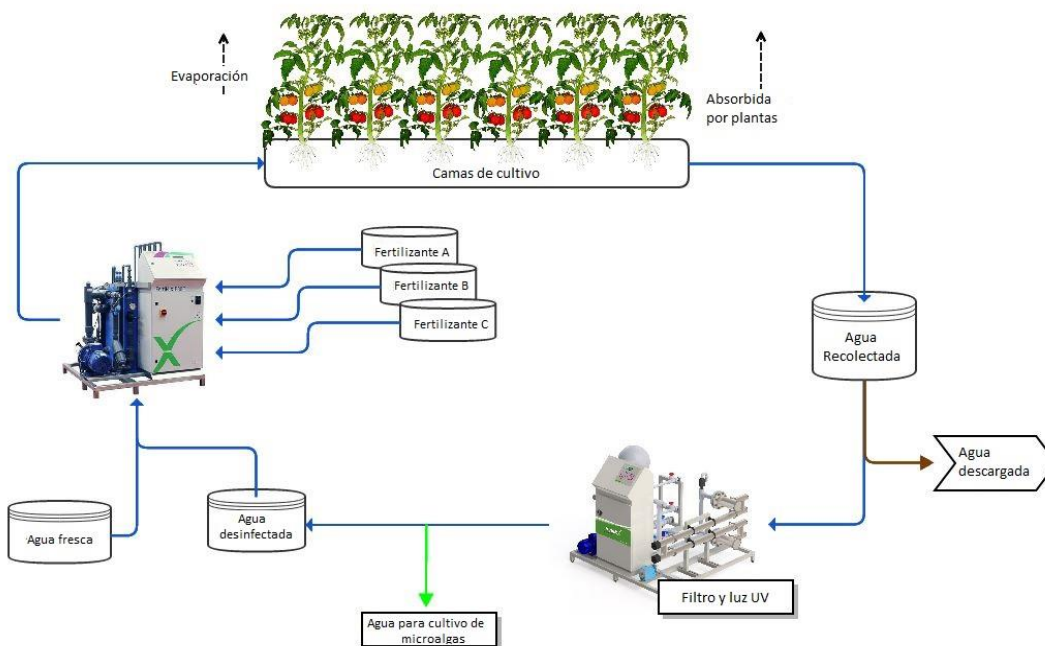


Figura 2. Ciclo del agua en los invernaderos del Agropark

Se le llama tratamiento terciario al que tiene por objetivo remover los iones por métodos biológicos o químicos, siendo los primeros mucho más baratos que los segundos, además de que éstos últimos pueden generar contaminación secundaria al añadir otro químico o propiciar la formación de un nuevo compuesto (Gouveia et al. 2016). Por ende, la opción biológica es más viable y amigable con el medio ambiente.

Para este último tratamiento, el cultivo de microalgas es una opción prometedora gracias a la habilidad que tienen de tomar el nitrógeno y fósforo inorgánicos, así como otros macro y micronutrientes (carbono, magnesio, zinc, hierro entre otros), y utilizarlos como fuente de alimento para su reproducción. Utilizando esta técnica no sólo se reduce la contaminación, sino que se obtiene un producto de alto valor agregado a partir de un desecho y se reducen los costos de producción (Zheng et al. 2013; Di Caprio et al. 2015).

En 1969, Palmer realizó un compilado de 165 artículos en donde identificó 80 diferentes especies de algas con mayor tolerancia a contaminantes orgánicos. De estos, los ocho géneros más resistentes fueron *Euglena*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium*.

Mohamed señaló en 1994 que el género *Scenedesmus* sp. es comúnmente encontrado en los diferentes cuerpos de agua, por lo que juega un papel importante en la purificación de la misma. Este género ha sido estudiado ampliamente para tratamiento de agua ya que está adaptada a ambientes con alto contenido de nutrientes (Abdel et al. 2012; Nwoba et al. 2016). También ha sido encontrada como especie dominante en aguas de descarga de invernaderos hidropónicos (Hultberg et al. 2013).

Estudios realizados con *Scenedesmus obliquus* cultivada en agua residual, demostraron que esta especie tuvo un mayor crecimiento que la densidad media de otros cultivos, siendo 1.9 g L^{-1} y 0.5 g L^{-1} en peso seco respectivamente (Abdel et al. 2012).

2.3 Microalgas

Las microalgas son organismos simples, fotosintéticos, que pueden ser unicelulares o pueden agruparse para formar filamentos. Este término abarca tanto células eucariontes y cianobacterias, aunque actualmente a éstas se les llama como tal para diferenciarlas de las microalgas eucariontes (Cai et al. 2013). Debido a que tienen múltiples características que no pueden ser englobadas en una misma rama filogenética, la definición de microalga incluye a los organismos fotosintéticos que no tienen diferenciación de raíces u hojas (Bellinger & Sigee 2010).

Una de las algas más comunes en la actualidad es la especie *Spirulina*, o *Arthrospira*, ya que ha sido popularizada como complemento alimenticio gracias a su alto contenido de proteínas (>50% en relación a su masa), además, cuenta con 18 de los 20 aminoácidos esenciales, vitaminas A, K, B6, B12; contiene minerales como calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, potasio; clorofila y lípidos mono y poliinsaturados. El cultivo de *Spirulina* ha tenido mucho auge no sólo por el gran aporte nutricional que tiene, sino porque, al ser un alga filamentosa, su cosecha resulta más sencilla y con menor gasto de energía que las microalgas unicelulares. Sin embargo, su cultivo requiere de altas concentraciones de sal ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ o mayor), lo que implica un gasto más en la producción, por no mencionar la contaminación del agua utilizada como medio (Belay, 2013).

Otros géneros de microalgas, como *Chlorella*, también son cultivadas a gran escala con fines comerciales. Principalmente se vende como complemento alimenticio por su alto contenido de proteínas (hasta más del 50% en peso seco). La especie *Chlorella vulgaris* también contiene lípidos mono y poliinsaturados, como C16 y C18, incluyendo C16:2,

C18:1, C18:2 y C18:3; vitaminas del tipo provitamina A, vitaminas B 1, 2, 6 y 12; C, E y ácido fólico, además de minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, entre otros; clorofila a y b, carotenoides como β -caroteno y luteína en bajas proporciones (Liu & Hu, 2013). No obstante, una de las aplicaciones con mayor interés es la producción de biodiesel dado que las microalgas, a diferencia de los alimentos, tienen un crecimiento más acelerado, mayor porcentaje de contenido lipídico y requiere de menos superficie para ser cultivadas (Mata et al. 2013; Santo 2014).

Una ventaja de *Chlorella* es que su cultivo no requiere de altas concentraciones de sales y tiene facilidad de tomar nutrientes inorgánicos, así como tomar el nitrógeno de diferentes fuentes, ya sea como amonio, urea o nitratos (Månsson 2012). No obstante, la separación de la biomasa del medio conlleva a un gasto energético del 20 al 30% del coste total (Santo 2014).

Además de temperatura, luz y pH óptimo, las microalgas necesitan de nutrientes primarios: carbono, nitrógeno y fósforo; así como de micronutrientes (en cantidades traza): sulfuro, potasio, magnesio, calcio, fierro, manganeso, zinc, cobre, silicio, entre otros. Estos requerimientos añaden un gasto más a la producción, sobre todo si es a gran escala. De ahí que el uso de agua residual como medio de cultivo es una opción viable y mucho más económica, pues contiene todos los micro y macronutrientes en cantidades suficientes para mantener un cultivo de microalgas (Christenson & Sims 2011). Su fácil cultivo y rápida adaptabilidad otorgan la ventaja de producir biomasa al mismo tiempo de tratar el agua, con lo que disminuye el daño ambiental que provoca su descarga.

Gracias a lo expuesto anteriormente, ha existido un interés por cultivar las microalgas a gran escala para poder generar biomasa que sea vendida como complemento alimenticio, biofertilizante o para extraer algún metabolito y desarrollar un producto con él. Sin embargo, debido a las dificultades que se tienen en el escalamiento de los cultivos, la producción masiva requiere de un alto costo de inversión ya que el control de los factores como temperatura e irradiación de luz es más difícil y costoso que hacerlo a escala laboratorio. Por esta razón, muchas empresas a nivel internacional se han dedicado a producir biorreactores con diferentes características para incrementar la productividad y reducir los costos de producción (Zittelli et al. 2013).

2.4 Efecto de la temperatura en los cultivos de microalgas

La productividad en un cultivo de microalgas depende de varios factores, siendo uno de los más importantes la temperatura. Esta puede influir directamente en la capacidad de las células para remover los nutrientes del medio, ya que el metabolismo es altamente sensible a los cambios de temperatura (Xin et al. 2011; Ruiz et al. 2015).

Normalmente las microalgas son cultivadas alrededor de 25°C; sin embargo, el rango de temperatura en que se presenta el óptimo de crecimiento varían entre las diferentes especies, por lo que este rango puede comprender desde los 10°C hasta 39°C en algunas especies, como *Chlorella* (Sorokin & Myers 1953; Li et al. 2011; Ruiz et al. 2015).

Zhang (2015) cultivó *Chlorella* sp. a diferentes temperaturas (12, 15, 25 y 38 °C) en medio BG11 para identificar bajo qué condiciones las microalgas producían más lípidos y encontró que a menor temperatura había más producción. En cuanto al crecimiento, la diferencia en concentración celular del cultivo a 12°C y el de 25°C fue de 0.8×10^7 células por mililitro (Zhang et al. 2015); en el mismo trabajo hacen referencia a una investigación previa en donde encontraron que *Scenedesmus* sp. LX1 no presentó diferencia significativa en su crecimiento en un rango de temperaturas desde 10 hasta 30°C (Xin et al. 2011).

Los resultados anteriores concuerdan con los encontrados por Cabello et al (2015), quien encontró que la máxima actividad fotosintética de *Scenedesmus obtusiusculus* es a 35°C, y va disminuyendo a mayores temperaturas, como también pasa con *S. almeriensis*.

En estrecha relación al crecimiento está la capacidad de las microalgas en asimilar los nutrientes del medio. Ruiz et al. (2016) llevó a cabo un experimento en el que midieron el comportamiento de una mezcla nativa, con predominancia de *Scenedesmus* sp., para absorber los nutrientes a diferentes temperaturas y encontraron que el comportamiento a 26°C y a 34°C no mostraba diferencias significativas. Sin embargo, de acuerdo al modelo diseñado por Ratkowsky y Bernard & Rémond, el óptimo de remoción de nutrientes para *Scenedesmus* sp. es a 30°C (Ruiz et al. 2016)

No obstante, la influencia de la temperatura en un cultivo es dependiente de la especie cultivada (Xin et al. 2011) por lo que es importante seleccionar la especie de microalga que se adapte mejor a las condiciones del medio ambiente donde se va a cultivar (Markou & Georgakakis 2011).

Los resultados expuestos anteriormente fueron obtenidos a nivel laboratorio, donde el máximo volumen utilizado fue de 2 litros, lo que facilita mantener la temperatura estable. Al

incrementar el volumen de cultivo este control no sólo se vuelve más complicado, sino que implica un gasto extra de energía para mantener la temperatura dentro de un rango.

2.5 Fotobioreactores

Se le llama fotobioreactor (FBR) al sistema de cultivo para organismos fotótrofos en donde los fotones no inciden directamente sobre el cultivo, sino que atraviesan una pared transparente antes de alcanzar a las células cultivadas. Existen diversos tipos de FBRs, divididos de acuerdo a su diseño: planos, tubulares, horizontales, verticales y en espiral; por su forma de operar: mezclado con bombas de aire y agua, una fase y dos fases; o por el tipo de material con el que es construido: plástico, vidrio, rígidos o flexibles (Zittelli et al., 2013).

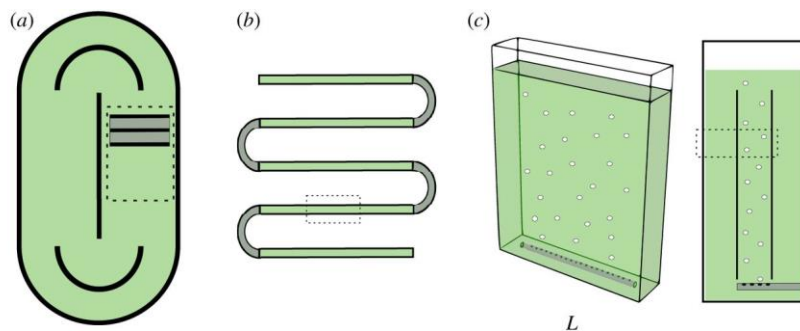


Figura 3. Diferentes tipos de biorreactores para microalgas: a) Estanque tipo raceway (abierto), b) tubular, c) panel plano (cerrados).

Cada diseño de FBR ofrece distintas ventajas ante los demás, y la elección entre uno u otro depende de la localidad en la que se harán los cultivos o incluso de la especie de microalga que se desea cultivar.

Generalmente se busca de un FBR que permita a todo el cultivo tener una irradiación de luz uniforme, así como estar en agitación constante para promover el intercambio gaseoso entre CO_2 y O_2 . Esto es con el fin de lograr la mayor producción posible y disminuir el problema de perder productividad a medida que se incrementa el volumen del cultivo (Zitelli et al., 2013).

Muchas empresas a nivel internacional están dedicadas a implementar nuevas tecnologías para diseñar y desarrollar fotobioreactores que impliquen un menor costo de operación y mayor facilidad de operación. Por ello, las nuevas tecnologías contienen sistemas

automatizados capaces de controlar la temperatura, el pH, la densidad del cultivo, entre otros.

Los bioreactores más utilizados debido a su bajo costo de inversión y mantenimiento son los sistemas abiertos, pues no necesitan de un sistema de control de temperatura (el agua caliente sale del cultivo por evaporación) y requieren poca inyección de CO₂ pues lo toman del ambiente ayudando incluso a combatir el efecto invernadero, aunque la concentración de dióxido de carbono no es suficiente para satisfacer la demanda del cultivo. No obstante, presenta muchas desventajas, principalmente la incapacidad de controlar la contaminación externa, poca irradiación lumínica por auto sombreado de las capas de agua superficiales hacia las más profundas, y poca difusión de gases, lo que conlleva a tener bajos rendimientos de producción y con esto, elevar el costo de cosecha por la baja densidad del cultivo (Christenson & Sims 2011).

El otro tipo de sistemas más comúnmente utilizados son reactores cerrados, generalmente tubulares o paneles. Estos, a comparación de los abiertos, permiten tener un monocultivo pues al no estar en contacto con el medio no sufre de contaminaciones. Otra ventaja es que permite regular la temperatura, cantidad de O₂ y CO₂, y pH. Gracias a esto, la productividad es mayor, es decir, se obtiene más biomasa por litro de medio (Acién et al. 2013).

Muchos estudios han sido realizados en todo el mundo utilizando diferentes tipos de bioreactores, a fin de encontrar las condiciones adecuadas para obtener un producto, ya sea mayor producción de biomasa, más absorción de nutrientes, incrementar la concentración de lípidos, antioxidantes, entre otros.

A pesar de que en los cultivos cerrados se tiene mayor control de los sistemas y que la posibilidad de contaminación es bastante reducida, siempre tienen un costo más elevado que los sistemas abiertos en su operación, sobre todo porque involucran un gasto extra al suministrar CO₂ y regular la temperatura. Por esta razón también es importante buscar una microalga que sea resistente a cambios climáticos y tenga una alta tasa de crecimiento (Santo 2014).

III. HIPÓTESIS

El crecimiento de *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris*, así como su capacidad para remover nutrientes de agua residual de invernaderos, varían con respecto a la temperatura del cultivo.

IV. OBJETIVOS

- **General**

Determinar la producción de biomasa y absorción de nitratos y fosfatos de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* bajo diferentes temperaturas, cultivadas en agua de descarga de invernaderos.

- **Específicos**

- Establecer el cultivo de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*.
- Determinar el rendimiento de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* en biomasa.
- Cuantificar el consumo de fosfatos y nitratos de las dos especies de microalgas.
- Comparar resultados de consumo de nutrientes y producción de biomasa obtenidos entre las dos especies.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de las especies

La microalga *Chlorella vulgaris* 3 CH fue donada por el Laboratorio de Hidrobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana, campus Iztapalapa (UAM-I), la cual fue aislada del lago de Chalchoapan Veracruz.

Scenedesmus sp. fue obtenida previamente en el laboratorio de microalgas de la Universidad Autónoma de Querétaro, a partir de muestras de agua de descarga de invernaderos, mediante aislamiento con pipeta. Esta microalga fue seleccionada debido a que presentó dominancia en el agua, además de rápido crecimiento en experimentos previos.

5.2 Establecimiento de cultivos

5.2.1 Agua de invernaderos

Para todos los experimentos se utilizó agua de descarga de invernaderos hidropónicos con cultivos de jitomate. Las muestras fueron tomadas después de que el agua fue filtrada y tratada con luz UV durante 20 minutos, en el equipo VitaLite de la empresa Hortimax®.

5.2.2 Cultivo en fotobioreactor.

Previo a la inoculación en el fotobioreactor (FBR), ambas microalgas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de 100 ml, en fertilizante foliar bayfolan® forte de la marca Bayer al 0.1% con agua destilada (Falcón, 2012). Los matraces se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital, bajo iluminación artificial con un periodo de 13:11 luz/obscuridad utilizando una lámpara fluorescente de 32 W. Al llegar a una densidad óptica de 1, midiendo en espectrofotómetro a 750 nm, se tomó el inóculo de cada especie para ser cultivada en el FBR de panel plano Algaemist-S. En este FBR se pueden controlar las condiciones de cultivo como fotoperiodo, temperatura, pH e intensidad de luz sin tener ruido externo (Figura 4). Estas variables son monitoreadas cada minuto y los datos son almacenados en la computadora.

El volumen del inóculo fue de 30 ± 10 ml aproximadamente, y se completó la máxima capacidad del reactor (390 ml) con agua de invernaderos. La variación del inóculo se debe a que en todos los cultivos se buscó tener una densidad inicial de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para evitar fotooxidación de las células (Cabello et al. 2015).



Figura 4. Fotobioreactor Algaemist-S. Cultivo a escala laboratorio con 390 ml de capacidad aproximadamente.

5.2.2.1 Condiciones de cultivo

Cada especie fue cultivada bajo cuatro diferentes temperaturas, manteniendo el pH, la intensidad de luz, fotoperiodo y aireación constantes. Estas condiciones fueron elegidas en base a cultivos realizados en trabajos anteriores (Mata et al. 2012; Di Caprio et al. 2015; Ruiz et al. 2015) y se muestran en el cuadro siguiente.

Temperatura	23, 27, 31 y 35°C
Aireación	500 ml·min ⁻¹
pH	7
Fotoperiodo	13:11
Luz	Sinusoidal (día/noche)
Máxima intensidad·día	998.63 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Cuadro 1. Condiciones de cultivo para *Scenedesmus* y *Chlorella vulgaris*.

De acuerdo a la bibliografía el óptimo de temperatura para microalgas de agua fresca se encuentra entre los 25 a 35 °C (Acién et al. 2013; Hernández & Labbé 2014). Este último valor concuerda con la máxima temperatura ambiental alcanzada en la zona de Colón, Querétaro. Por encima de esta temperatura está registrado que la actividad fotosintética decrece debido a la desnaturalización de los fotosistemas (Cabello et al. 2015), por lo tanto, las microalgas comienzan a morir.

5.3 Cuantificación de parámetros

5.3.1 Concentración celular

Las muestras del fotobioreactor se tomaron por triplicado desde el desagüe, en la parte inferior del mismo. Antes de tomar cada muestra se agitó el cultivo con un imán colocado dentro del reactor. Posteriormente se recuperó el volumen con agua destilada (no más de 10 ml por día).

La densidad del cultivo se midió mediante densidad óptica a 750 nm, tomando como blanco el agua de descarga de invernaderos sin microalgas, haciendo diluciones cuando la concentración del cultivo estaba por encima de 1.

El peso seco se midió para saber la cantidad de biomasa en gramos por litro que había en el cultivo. Por triplicado se dejaron filtros GF/A, de 1.6 µm de poro, a peso constante en horno a 80°C por 24 horas, previamente lavados con agua destilada. Al siguiente día se dejaron enfriar dentro de un desecador por una hora. Después de registrar el peso de cada filtro, se colocaron en un embudo Büchner sobre un matraz kitazato. Con la ayuda de una bomba de vacío, se lavaron de nuevo con agua destilada y se filtraron 3 ml de cultivo. Al final se volvieron a lavar con agua destilada para eliminar otras partículas. Los filtros se colocaron de nuevo en el horno para dejarlos secar durante 24 horas. Pasado este tiempo y una hora de enfriamiento, se registró de nuevo el peso. El valor en gL⁻¹ se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso Seco (gL}^{-1}\text{)} = \frac{PS_0 - PS_1}{0.001 * Vol} \quad (1)$$

Donde PS₀ es el peso del filtro sin muestra, PS₁, con muestra y Vol, el volumen filtrado (3 ml).

5.3.2 Concentración de nutrientes

La cuantificación de nitratos y fosfatos se realizó igualmente por triplicado, en espectrofotómetro marca HACH, modelo DR6000. En ambas pruebas se filtraron la muestra con acrodiscos marca Sartorius con 0.2 µm de poro, y se siguieron los protocolos descritos en el manual del espectrofotómetro, descritos a continuación (Posadas et al. 2015):

Para nitratos se hizo una dilución 1:50 con el filtrado y agua destilada. A las muestras se les agregó el reactivo Nitruver 5. Se agitaron durante un minuto y dejaron en reposo por cinco más. Se utilizó el programa 355 del espectrofotómetro para leer la muestra. El blanco fue la misma muestra diluida sin reactivo.

En la prueba de fosfatos se utilizó el programa 490, haciendo una dilución 1:80 muestra-agua destilada. Se agregó el reactivo Phosver 3 a la dilución, después se agitó 30 segundos y se dejó en reposo por dos minutos. El blanco fue la dilución sin reactivo.

5.4 Cálculos de variables

Para normalizar los resultados se calculó el crecimiento específico de cada cultivo (μ , d^{-1}) de acuerdo a la siguiente fórmula (Roleda et al. 2013):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Donde X_2 y X_1 representan la concentración celular en los tiempos t_2 y t_1 , considerando los días de la fase exponencial.

El tiempo requerido para obtener el doble de biomasa se llama tiempo de duplicación (t_d) y se calcula con la fórmula (Gani et al. 2016):

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (3)$$

La remoción de nutrientes en porcentaje (%) fue obtenida de acuerdo a la fórmula 4 (Gani et al. 2016).

$$\text{Porcentaje de remoción nutrientes, \%} = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100 \quad (4)$$

Siendo C_i la concentración de nutrientes inicial y C_f , la final.

La productividad (r_x) se calcula con la siguiente fórmula ($g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$):

$$r_x = \frac{C_f - C_i}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

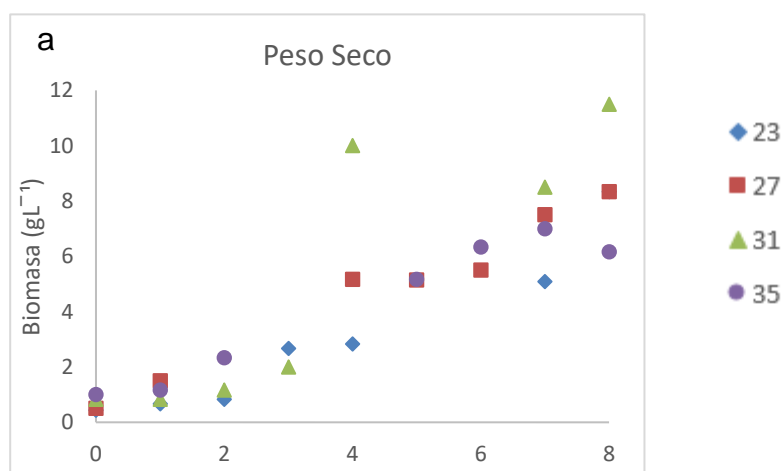
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron cultivos Batch con el fin de alcanzar el máximo de biomasa que se puede tener utilizando agua de descarga de invernaderos como fuente de nutrientes. Los resultados de remoción de nutrientes, crecimiento específico y productividad fueron calculados en la etapa exponencial de cada cultivo. De esta manera es posible determinar el tiempo que tardan las microalgas en consumir los nutrientes antes de que se presente muerte celular. Todos los resultados están expresados como las medias de los triplicados junto con sus desviaciones estándar, aunque en algunos casos éstas no son apreciables debido a que son muy pequeñas.

6.1 Crecimiento y remoción de nutrientes en *Chlorella vulgaris*

La máxima producción de biomasa fue de $11.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtenidos al octavo día en el cultivo a 31°C (figura 7). Este valor está muy por encima de los valores obtenidos normalmente en producción de microalgas (Hultberg et al. 2013; Gressler et al. 2014; Cabello et al. 2015; Di Caprio et al. 2015; Zhang et al. 2015; Gouveia et al. 2016) debido a que este reactor permite obtener altas concentraciones de biomasa (Tuantet et al. 2014).

Como se puede observar en la gráfica de densidad óptica, la etapa logarítmica no es uniforme en todos los cultivos pues en cada uno comienza en diferentes días. A 31 y 35°C el crecimiento exponencial inicia al segundo día, a diferencia del cultivo a 23 y 27°C , donde empieza hasta el tercer y cuarto día, respectivamente.



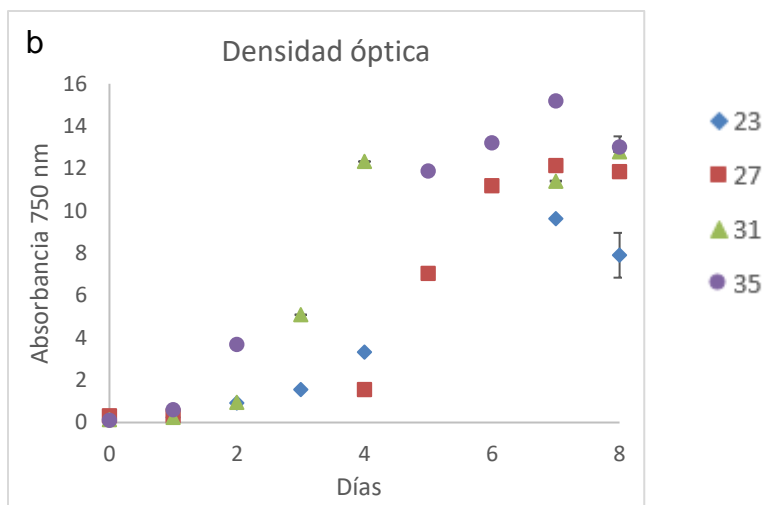


Figura 5. Crecimiento de *C. vulgaris* a diferentes temperaturas. a) Concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y b) densidad óptica a lo largo los cultivos. Las barras de error demuestran la desviación estándar entre los triplicados y son visibles cuando el valor es mayor al tamaño del marcador.

Para calcular el crecimiento específico, la remoción de nutrientes y la productividad se tomaron en cuenta los días en que el cultivo se encontraba en fase logarítmica, considerando que en un cultivo semicontinuo siempre se trata de mantener esta etapa.

El máximo crecimiento específico (μ) obtenido fue de 1.27 d^{-1} también en el cultivo de 31°C , el cual es dos veces mayor que aquél obtenido a 23°C . Ya que la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las microalgas, el valor de μ se ve directamente afectado por los cambios de temperatura, como se ve en la figura 8. Éste comportamiento sigue el modelo de crecimiento de las microalgas cultivadas bajo diferentes temperaturas (Bernard & Rémond 2012). Serra et al (2016) reportó que entre 18 y 25°C el crecimiento específico no muestra diferencia significativa, sino que éste sólo es afectado en altas temperaturas.

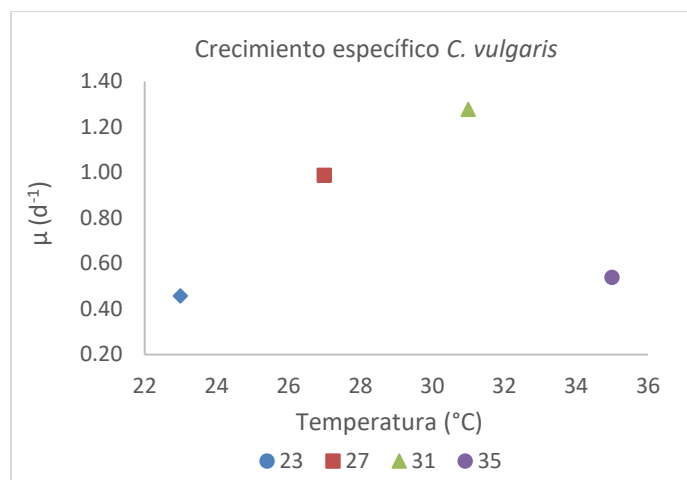


Figura 6. Crecimiento específico de *Chlorella vulgaris* en las diferentes temperaturas.

Siguiendo el mismo comportamiento, la mayor remoción de nitrógeno-nitratos fue de 193.10 mg·L⁻¹, a 31°C. Entre esta temperatura y 23°C, donde se presentó la menor remoción, hay una diferencia de 73.5 mg·L⁻¹. Sin embargo, la concentración de fosfatos disminuyó más a 27°C (figura 9). Esto se debe a que las microalgas introducen en sus células casi todo el fosfato disponible en el medio de manera inmediata, por ello, el cultivo de 27°C, al tener mayor concentración inicial de fosfatos, presenta una mayor remoción de los mismos. Para evitar estas diferencias se hizo la normalización de los datos calculando la relación entre la biomasa y el peso seco, como se describirá más adelante.

La diferencia en la concentración inicial entre los cultivos se debió a que el agua tomada del invernadero tenía composición diferente en los diferentes momentos en que fue muestreada, pues la cantidad de fertilizantes agregados depende de la etapa del cultivo. Se recomienda que para futuros experimentos se normalice añadiendo nitratos al medio o por centrifugación del inóculo para también evitar añadir nutrientes del medio de cultivo.

Cassidy et al. (2011) también encontró que a 30°C el crecimiento de *C. vulgaris* es mayor, comparado con 25 y 35°C. Por el contrario, Converti et al (2009) no encontró diferencia en el crecimiento específico a 25 y 30°C, y sólo una disminución de 0.02 d⁻¹ entre éstos y 35°C. Serra et al. (2016) encontró que el óptimo estaba en 23.3°C de acuerdo con un modelo descrito en su publicación. Por la diferencia de cepas utilizadas es importante realizar un estudio para evaluar el comportamiento de la cepa de interés.

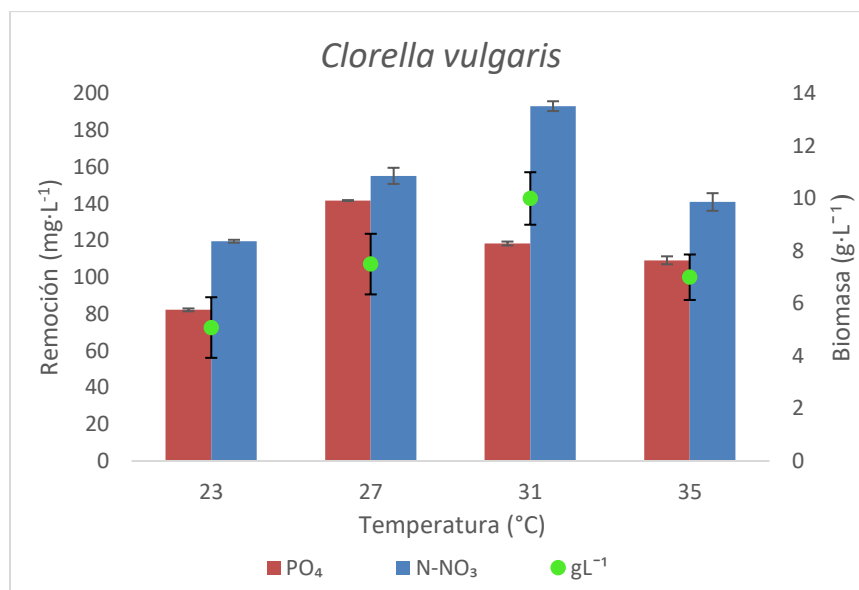


Figura 7. Remoción de nutrientes (N-NO₃ y PO₄) en *C. vulgaris* (en barras, valores a la izquierda) y máxima producción de biomasa (en círculos, valores a la derecha).

La relación entre biomasa y concentración de nutrientes a lo largo del cultivo fue calculada para normalizar las variaciones de los valores entre cada experimento, con el fin de determinar el día en que se tiene la máxima remoción de nutrientes (figura 10). La razón inicial es de 2.76 ± 0.48 en nitrógeno y 0.196 ± 0.083 en fósforo.

Al cuarto día de cultivo se obtuvo la relación menor a 0.013 en las tres primeras temperaturas. En el cultivo a 35°C no se tomó muestra en este día, sin embargo, en el séptimo día se presenta el valor mencionado anteriormente por lo cual es probable que antes de este día la relación haya sido mayor.

Con estos datos podemos sugerir que, en un cultivo semicontinuo bajo estas condiciones las diluciones se realicen en el día cuatro de cultivo, ya que será el momento en que la concentración de nutrientes es baja y la biomasa tendrá poco incremento pasado ese día.

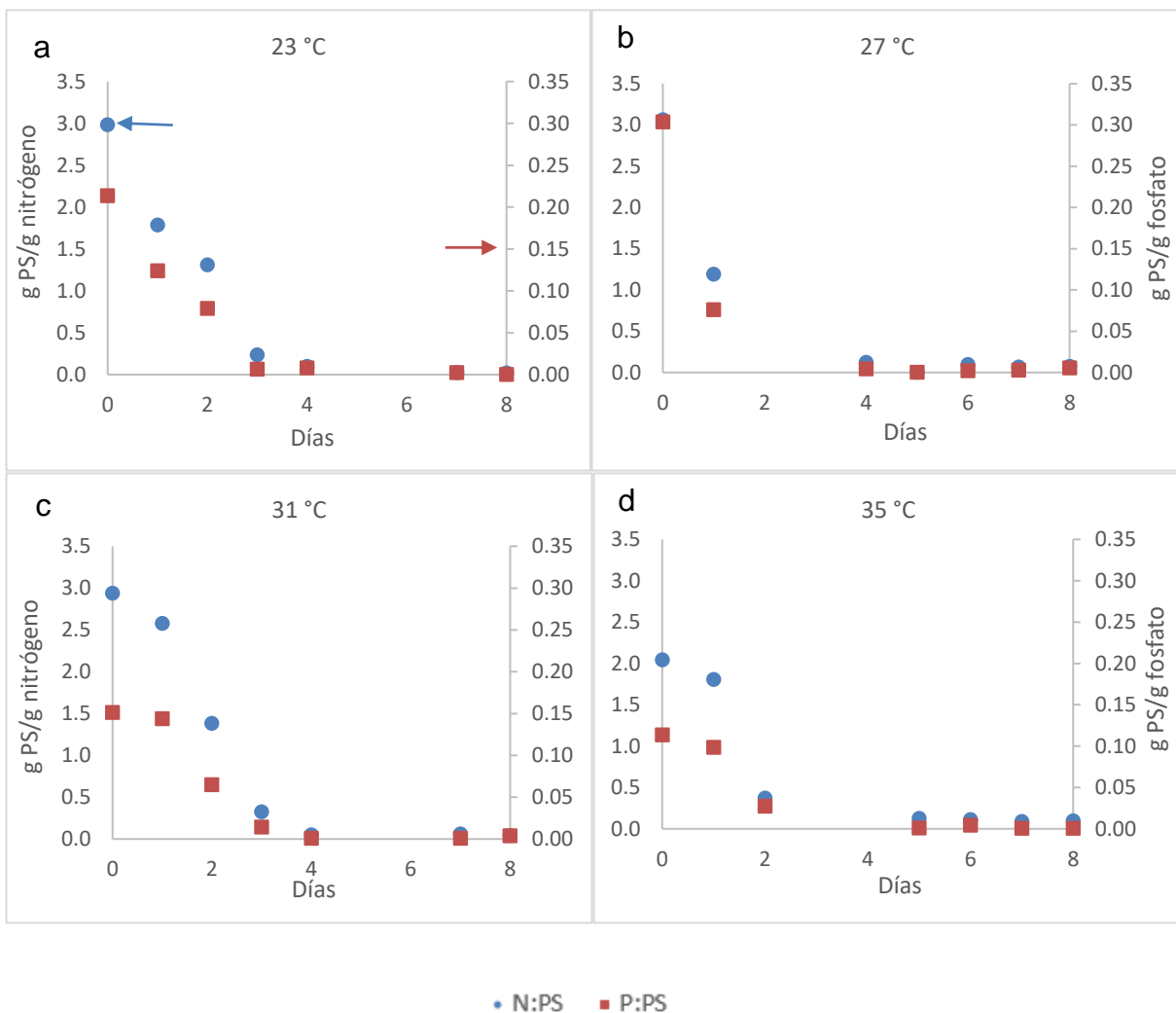


Figura 8. Relación entre concentración de nutrientes y peso seco. El eje 'y' a la derecha muestra valores en gramos de Peso seco por gramos de nitrógeno, mientras que el eje 'y' izquierdo muestra valores de peso seco por gramos de fosfatos.

Es importante resaltar que al haber hecho los cultivos en modo Batch, la luz puede llegar a ser un factor limitante al tener una alta concentración de biomasa, por lo que en este punto no sólo la temperatura puede afectar el crecimiento, sino también la alta densidad del cultivo. Con el fin de evitar que se presente esta inhibición, es importante diluir el cultivo al alcanzar el máximo punto de la fase exponencial.

Blair et al. (2014) obtuvieron la máxima productividad para *C. vulgaris* de $0.0893 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en cultivos en matraces Erlenmeyer, con una concentración de nitratos a 25% (62.25 mgL^{-1}) de la recomendada por la casa comercial. En este estudio se sugirió que la máxima

concentración de nutrientes no siempre lleva a obtener la máxima producción de biomasa (Blair et al. 2014), es decir que la concentración de nitratos iniciales no garantiza la concentración de biomasa que se obtendrá en el cultivo.

El cuadro 2 muestra la productividad (r_x) y el tiempo de duplicación (Td) de los diferentes cultivos. Como se puede ver, los mejores resultados también se obtuvieron a 31°C, siendo r_x más alto que el obtenido por Blair et al (2014), pero no más alto que aquél de Tuantet et al. (2014), en donde se utilizó *C. sorokiniana* cultivada el mismo tipo de reactor que en este trabajo, con orina humana diluída dos veces como medio de cultivo.

Cuadro 2. Productividad (r_x) y tiempo de duplicación (Td) de *C. vulgaris*.

Temperatura °C	r_x (g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Td d ⁻¹	% N-NO3 (mg·L ⁻¹)	% PO4 (mg·L ⁻¹)
23	0.60	1.52	91.11	87.58
27	0.80	0.70	84.71	93.35
31	4.42	0.54	78.87	93.81
35	0.86	1.12	66.08	75.65

De acuerdo a estos resultados podemos deducir que el crecimiento de *C. vulgaris* es más afectado por las bajas temperaturas que por las altas. Aun así, estos resultados sugieren que el crecimiento a temperaturas no óptimas afecta en gran medida la producción de biomasa, por lo que, para producir biomasa, es recomendable mantener el cultivo a 31 °C.

6.2 Crecimiento y remoción de nutrientes *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. ha sido encontrada en agua residual de varias fuentes, como urbana, industrial y de invernaderos. Por lo mismo, se ha utilizado para tratamiento en varios reportes (Palmer 1969; Månsson 2012; Hultberg et al. 2013; Posadas et al. 2015).

La máxima biomasa obtenida fue de 7.65 y 7.4 g·L⁻¹ para las temperaturas 23 y 31°C, respectivamente. En biomasa se obtuvo un decremento para estos dos cultivos al último día de cultivo, algo no presentado en la densidad óptica posiblemente a que en esta pueden existir interferencias de acuerdo a la etapa de cultivo, pues la pigmentación del mismo cambia (Griffiths et al. 2011).

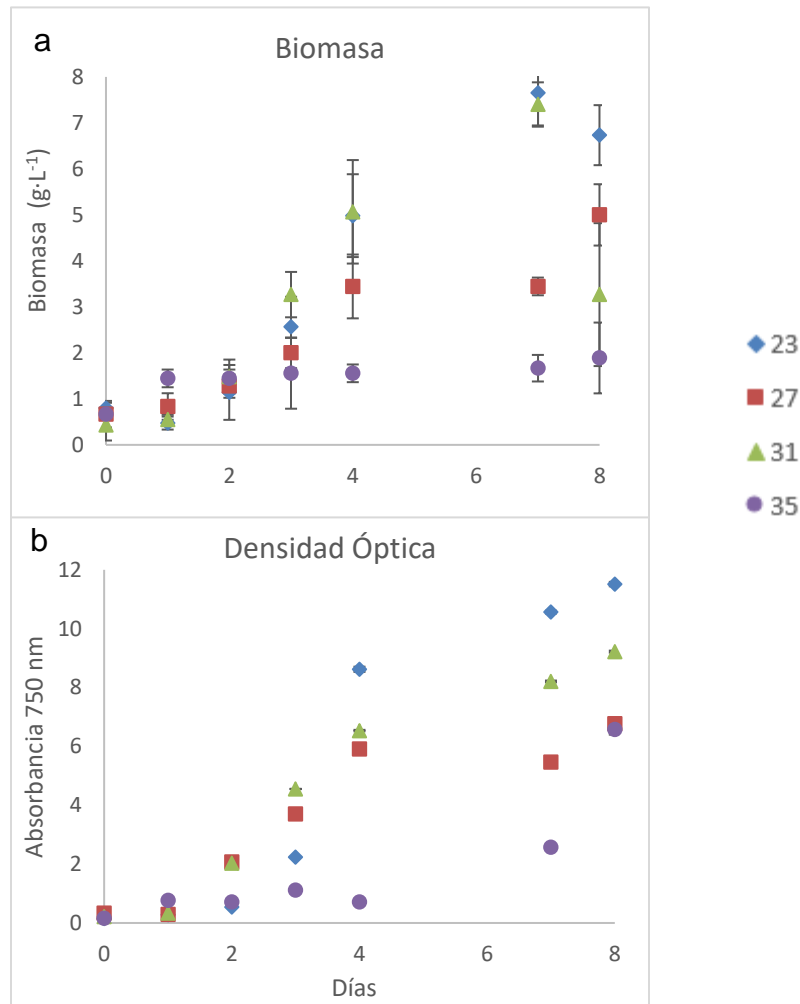


Figura 9. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en a) Peso seco ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y b) Densidad óptica.

Las barras de error demuestran la desviación estándar entre los triplicados

En el cultivo de 35°C sólo se alcanzó la fase logarítmica inicial, ya que la etapa de adaptación duró cinco días. Esto también fue visible en el cultivo, pues al inicio del día, durante los primeros cinco días, la biomasa se encontraba precipitada. No obstante, al séptimo día de cultivo, la densidad óptica comenzó a incrementar, aunque la biomasa sólo lo hizo en $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Seguramente esta pudo haber incrementado más si el cultivo se hubiera mantenido durante más tiempo. Debido a que el crecimiento exponencial empezó tardíamente, los cálculos no se realizaron de la misma manera que con los demás cultivos.

A diferencia de los cultivos con *C. vulgaris*, con *Scenedesmus* sp. el comienzo y fin de la etapa logarítmica fue homogéneo, por lo que el cálculo de crecimiento específico, remoción de nutrientes y productividad fue realizado en los mismos días para todos.

Aparentemente, las mejores temperaturas para producir biomasa fueron 23 y 31°C. Ésta última concuerda con los resultados de Hodaifa et al. (2010), quien reportó que la temperatura óptima para producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* en agua residual diluida de molinos de aceite de oliva, es a 29.6°C (Sánchez et al. 2008; Hodaifa et al. 2010) dijo que el óptimo se encuentra entre 30-35°C. De igual forma que en *C. vulgaris*, Cassidy et al. (2011) encontró que a 30°C *Scenedesmus* sp. tiene mayor crecimiento que a temperaturas más altas o más bajas. Sin embargo, el resultado de acuerdo al modelo de Remond y Bérnard, basado en resultados de Xin et al (2011), muestra el óptimo a 26.3°C

El resultado a 23°C no concuerda con lo encontrado en bibliografía, ni con el comportamiento esperado en relación a la variación de temperatura, ya que normalmente la producción de biomasa va incrementando conforme lo hace la temperatura hasta llegar al punto óptimo, después del cual decae drásticamente. En este caso, a 27°C la producción disminuye y a 31°C vuelve a aumentar.

Al calcular el crecimiento específico se observa un comportamiento más acorde a lo esperado, en donde el mejor resultado se presenta a 23°C (1.38 d⁻¹) y decrece conforme va aumentando la temperatura, aunque entre el cultivo a 27 y 31°C tienen una diferencia de 0.01 d⁻¹ (figura 12).

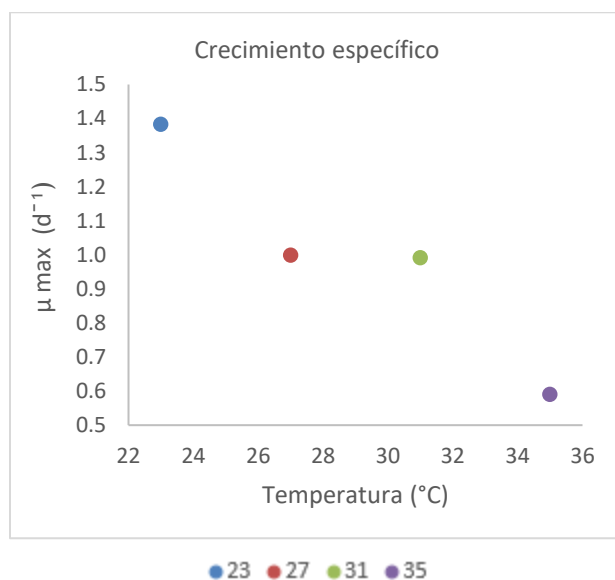


Figura 10. Crecimiento específico de *Scenedesmus* sp. La desviación estándar es muy pequeña, por lo que no se alcanza a apreciar en la gráfica.

De acuerdo con lo reportado por Ruiz et al. (2015), la máxima remoción de amonio se presentó a 30°C. Sus resultados siguieron el comportamiento predicho por el modelo CTMI, publicado por Bernard y Rémond (2012). De igual manera que el crecimiento específico, la capacidad de remoción de nutrientes depende directamente de la temperatura.

La cantidad de nutrientes removida sí corresponde a la curva típica del comportamiento de microalgas en respecto a la temperatura. Aunque en este caso se removió más cantidad de nitratos a 27°C (167.40 mg·L⁻¹) que a 31°C (121.93 mg·L⁻¹), como se hubiera esperado. Este resultado probablemente se dio porque la relación entre N:P al inicio del cultivo fue de 16.41 y 12.44 para 27 y 31°C, respectivamente, siendo la primera más favorable para el crecimiento de microalgas que la segunda (Arbib et al. 2013). Dicha relación también influye en la remoción de nutrientes, pues en ausencia de fósforo, la absorción de nitrógeno se ve reducida (Arbib et al. 2013).

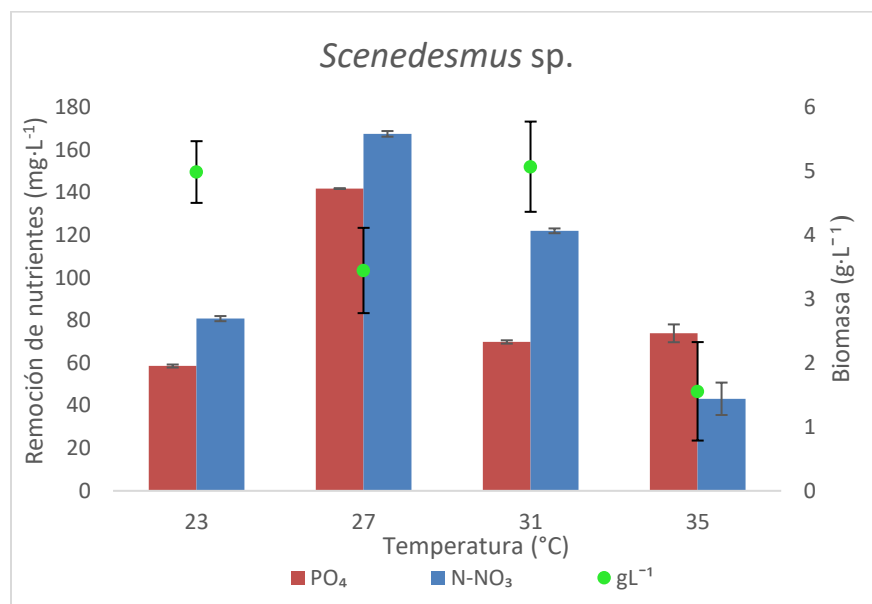


Figura 11. Remoción de nutrientes (N-NO₃ y PO₄) en *C. vulgaris* (gráfica de barras cuyo eje 'y' se muestra a la izquierda) y máxima producción de biomasa (gráfica de dispersión cuyo eje 'y' se encuentra a la derecha).

Al igual que en *C. vulgaris*, la relación entre contenido de nutrientes y biomasa fue calculada a lo largo de los experimentos, y de igual forma, a partir del cuarto día, los valores se mantenían constantes o son menores a 0.002 mg (figura 14). Esto también concuerda con el fin de la etapa logarítmica, lo que quiere decir que para mantener la fase exponencial se deben realizar la dilución en este día.

En cuanto a la productividad y el tiempo de duplicación, los mejores valores nuevamente están en los cultivos a 23 y 31°C, como se muestra en el cuadro 3. Nayak et al. (2016) obtuvieron una productividad de $0.0661 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ cultivada en un fotobioreactor. Esto indica que los valores aquí obtenidos son relativamente altos.

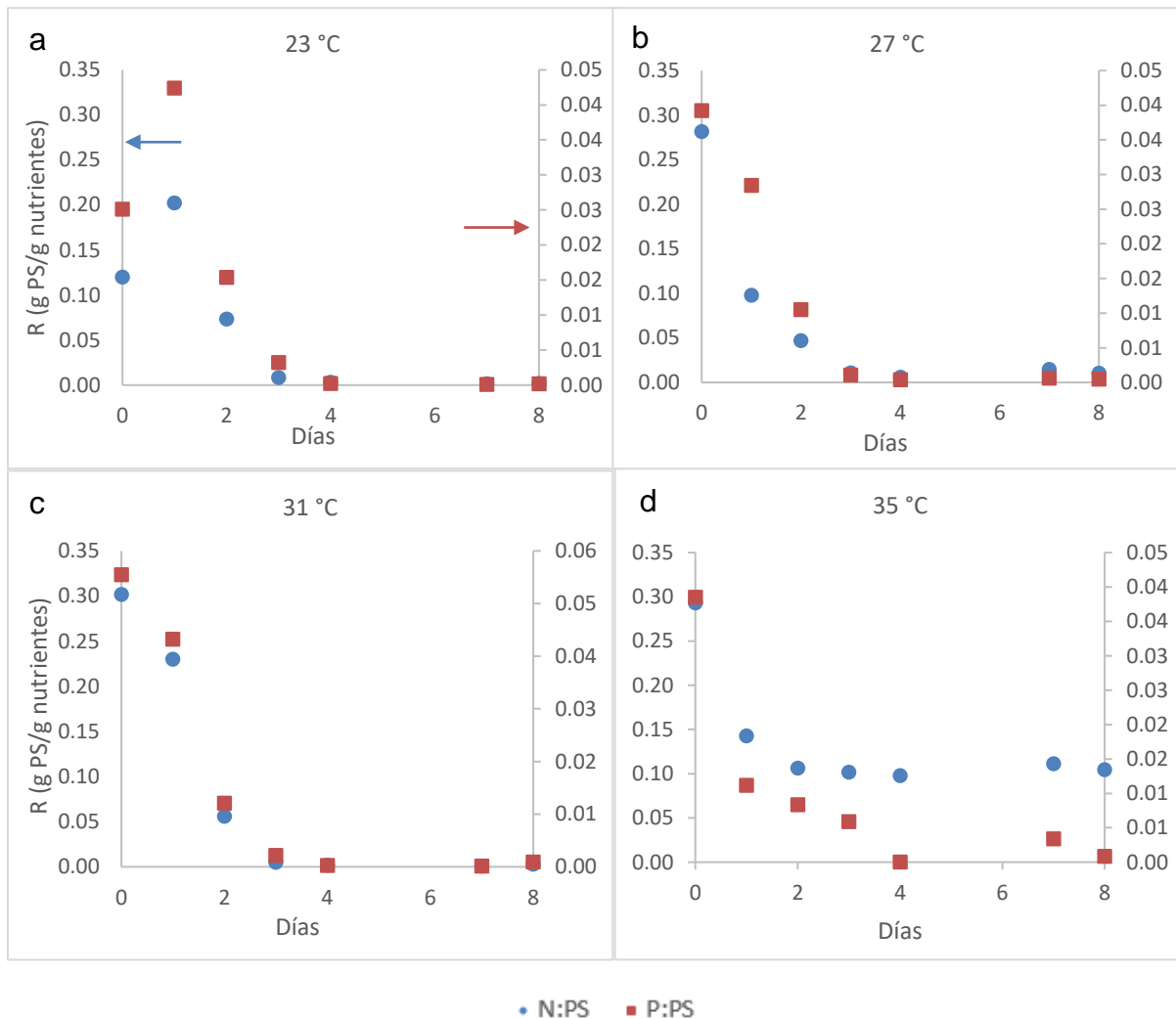


Figura 12. Relación entre concentración de nutrientes y peso seco. El eje 'y' a la derecha muestra valores en gramos de Peso seco por gramos de nitrógeno, mientras que el eje 'y' izquierdo muestra valores de peso seco por gramos de fosfatos.

Cuadro 3. Productividad (r_x), tiempo de duplicación (Td) y porcentaje de remoción de nutrientes en *Scenedesmus* sp.

Temperatura °C	r_x (g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Td (d ⁻¹)	% N-NO3 (mg·L ⁻¹)	% PO4 (mg·L ⁻¹)
23	1.92	0.50	84.42	95.16
27	0.87	0.69	89.19	94.96
31	1.51	0.70	93.30	94.80
35	0.08	1.17	22.08	64.29

En este caso sería recomendable hacer una repetición del cultivo a 23°C, ya que es el que no sigue el comportamiento esperado, para comprobar si los resultados presentados aquí son correctos o no, pues al realizar este experimento se presentaron problemas técnicos en el laboratorio, como la ausencia de luz en ocasiones intermitentes, lo que pudo haber hecho que la temperatura subiera.

Por último, para ambas especies se realizó una comparación del crecimiento obtenido experimentalmente con el predicho por el modelo de Verlhust (Gani et al. 2016) con el fin de evaluar si este modelo se ajusta a los datos obtenidos en estos experimentos (ver anexos). Para todos los cultivos el modelo se ajusta adecuadamente, excepto para aquel de *C. vulgaris* a 31°C. Este modelo no toma en consideración la etapa de muerte.

VII. CONCLUSIÓN

Las dos especies de microalgas fueron capaces de alcanzar altas concentraciones de biomasa cultivadas en agua de descarga de invernaderos hidropónicos sin necesidad de diluir el medio. El crecimiento específico de ambas fue afectado por la variación de temperatura, el cual decrementa a partir de los 31°C. Para ambas, la máxima biomasa fue encontrada a esta temperatura, aunque *Scenedesmus* sp. también presentó alta producción de biomasa y el máximo crecimiento específico a 23°C.

La temperatura afectó la producción de biomasa para las dos microalgas estudiadas, pero la relación entre biomasa y nutrientes que presentaron los cultivos en todas las temperaturas es la misma al cuarto día, es decir que, a pesar de que la temperatura varió, no lo hizo la velocidad en que los nutrientes fueron asimilados.

Ambas especies también demostraron ser eficientes en la remoción de nitrógeno-nitratos y fosfatos de 23 a 31°C. Además, demostraron tener resistencia a altas temperaturas. Esta afectó la remoción de nitrógeno-nitratos, y por lo tanto al crecimiento, pero una vez que la temperatura disminuyó, estos continuaron incrementando.

Cabe mencionar que este tipo de estudios es de los primeros que se hacen a nivel nacional, utilizando agua real proveniente de invernaderos.

Es posible cultivar microalgas y obtener una alta concentración de biomasa, a la vez que se reducen los nutrientes en más del 70% aún en altas temperaturas. Es factible, por lo tanto, mantener este tipo de cultivos para una producción continua (o semi continua) en la región de Colón, Querétaro.

VIII. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Como se mencionó anteriormente, la concentración de nutrientes provenientes del agua de invernaderos es totalmente dependiente de la etapa del cultivo en el que se encuentren las plantas, además de la planta que se tenga sembrada. Por eso es necesario hacer un estudio de la variación de los nutrientes en el agua a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Con ello se podría determinar en qué etapas se tendrá más producción de microalgas, o incluso si es necesario añadir algún nutriente.

Este trabajo es el primer paso hacia mantener cultivos semicontinuos, por lo cual, el siguiente paso es realizar estudios para evaluar el tiempo de retención hidráulica que favorezca tanto el crecimiento como la remoción de nutrientes durante un tiempo más prolongado para evaluar la influencia de las estaciones en el crecimiento de las microalgas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel, N., Al Homaidan, A.A. & Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), pp.257–275. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>.
- Acién, F.G., Fernández, J.M. & Molina, E., 2013. Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), pp.131–151.
- Andersen, R. A. 2013. The microalgal cell. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2nd Edition. pp. 3-20.
- Aqua-Terra-Nova, 2015. *Water Resource Survey Agropark Querétaro*. pp 33.
- Arbib, Z. et al., 2013. Photobiotreatment : influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Phytoremediation*, 15, pp.37–41.
- Baudelet, P.H. et al., 2013. Antiproliferative activity of *Cyanophora paradoxa* pigments in melanoma, breast and lung cancer cells. *Marine Drugs*, 11(11), pp.4390–4406.
- Belay A., 2013. Biology and industrial production of *Arthrospira (Spirulina)*. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2nd Edition. pp. 339-358.
- Bellinger, E.G. & Sigee, D.C., 2010. Freshwater Algae: Identification and use as Bioindicators. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. 1st Edition. pp. 284.
- Bernard, O. & Rémond, B., 2012. Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, 123, pp.520–527. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.022>.
- Blackburn S. 2013. Eutrophication and water poisons. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2nd Edition. pp. 581-594.
- Blair, M.F., Kokabian, B. & Gude, V.G., 2013. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>.

- Cabello, J., Toledo L., Sánchez L., Revah S. & Morales M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology*, 181, pp.128–135. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>.
- Cai, T., Park, S.Y. & Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, pp. 360-369
- Carvalho, A.P., Pontes I., Gaspar H. & Malcata F., 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3–4), pp.358–366.
- Cassidy K., 2011. Evaluating algal growth at different temperatures. *Theses and Dissertations-- Biosystems and Agricultural Engineering*. Paper 3.
- Christenson, L. & Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29, pp. 686-702.
- Converti A., Casazza A., Ortiz E., Perego P. & Del Borghi M., Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis* and *oculata Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48(6), pp. 1146-1151.
- Di Caprio, F., Altimari, P. & Pagnanelli, F., 2015. Integrated biomass production and biodegradation of olive mill wastewater by cultivation of *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, 9, pp.306–311. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.007>.
- Gani, P., Sunar N., Matias H., Jamaian S. & Latiff A., 2016. Effects of different culture conditions on the phycoremediation efficiency of domestic wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4), pp.4744–4753. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343716304006>.
- Gouveia, Graça L., Sousa C., Ambrosano L. et al., 2016. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs: Scale-up considerations. *Algal Research*, 16, pp.167–176.
- Gressler, P. et al., 2014. Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. *Environmental*

Technology, 35, pp.209–219.

Griffiths, M.J. et al., 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), pp.119–123.

Grobbelaar J. 2013. Inorganic Algal Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2nd Edition. pp. 123-133.

Hernández, A. & Labbé, J.I., 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), pp.157–173.

Herrera, A.L., 2000. Nutrient Solution Management in the Hydroponic Production of Tomato. *Terra*, 17, pp.221–229.

Hodaifa G. Martínez S & Sánchez S. 2010. Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), pp. 257-264.

Hultberg, M., Carlsson, A.S. & Gustafsson, S., 2013. Treatment of drainage solution from hydroponic greenhouse production with microalgae. *Bioresource Technology*, 136, pp.401–406. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.019>.

Janssen, M., 2002. Cultivation of microalgae : effect of light / dark cycles on biomass yield. *Unpublished Master's thesis Wageningen University Wageningen The Netherlands*, 1191(2006), p.184.

Kunjapur, A.M. & Eldridge, R.B., 2010. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(8), pp.3516–3526.

Lara H. 2000. Nutrient solution management in the hydroponic production of tomato. *Terra*, 17, pp. 221-229.

Li, Y. et al., 2011. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*, 102(23), pp.10861–10867. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.064>.

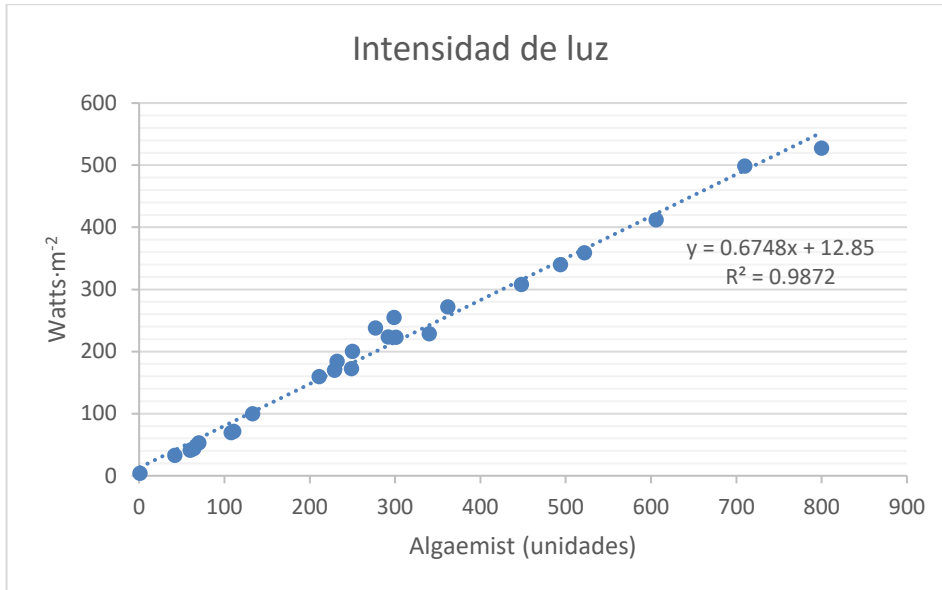
- Liu J & Hu Q. 2013. *Chlorella*: Industrial production of cell mass and chemicals. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2nd Edition. pp. 329-338.
- Månsson, S., 2012. *Cultivation of Chlorella vulgaris in nutrient solution from greenhouse tomato production*. Swedish University of Agricultural Sciences. Available at: <http://stud.epsilon.slu.se/4631/>.
- Mata, T.M., Almeida, R. & Caetano, N.S., 2013. Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *dunaliella tertiolecta*. *Chemical Engineering Transactions*, 32(2000), pp.973–978.
- Markou, G. & Georgakakis, D., 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), pp.3389–3401. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>.
- Nayak M., Karemore A. & Ramkrishna S. 2016. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, 16, 216-223.
- Nwoba, E.G. et al., 2016. Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent. *Algal Research*, 17, pp.268–276. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.022>.
- Palmer, C.M., 1969. A composite rating of algae tolerating organic pollution. *Journal of Phycology*, 5, pp.78–82.
- Posadas, E. et al., 2015. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chemical Engineering Journal*, 265, pp.239–248.
- Putra, P.A. & Yuliando, H., 2015. Soilless Culture System to Support Water Use Efficiency and Product Quality: A Review. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 3, pp.283–288.
- Raffaello Garofalo (coordinator), 2010. Deliverable 1.4: Report on biology and biotechnology of algae with indication of criteria for strain selection. , pp.1–133. Available at: <http://www.aquafuels.eu/deliverables.html>.
- Roleda, M.Y. et al., 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid

- production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 129, pp.439–449. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.043>.
- Ruiz, A. et al., 2015. Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 191, pp.346–349. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415007439>.
- Ruiz, A. et al., 2016. Modeling light and temperature influence on ammonium removal by *Scenedesmus* sp. under outdoor conditions. *Water Science and Technology*, 74(8), pp.1964–1970. Available at: <http://wst.iwaponline.com/cgi/doi/10.2166/wst.2016.383>.
- Santo, A., 2014. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Mecánica Y Electricidad*. Available at: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4656822&orden=1&info=link>.
- Serra R., Bernard O., Gonçalves A., Bensalem S et al. 2016. Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor. *Algal Research*, 18, pp. 352-259.
- Somerville, C. et al., 2014. Small-scale Aquaponic Food Production. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, p.288.
- Sorokin, C. & Myers, J., 1953. A high-temperature strain of *Chlorella*. *Science (New York, N. Y.)*, 117(3039), pp.330–331.
- Syrett, P.J. et al., 1986. Effects of nitrogen deprivation on rates of uptake of nitrogenous compounds by the diatom, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *New phytologist*, 102, pp.39–44. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00795.x/abstract>.
- Tuantet, K. et al., 2014. Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water Research*, 55, pp. 162-174.
- Xin, L., Hong-ying, H. & Yu-ping, Z., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), pp.3098–3102. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.

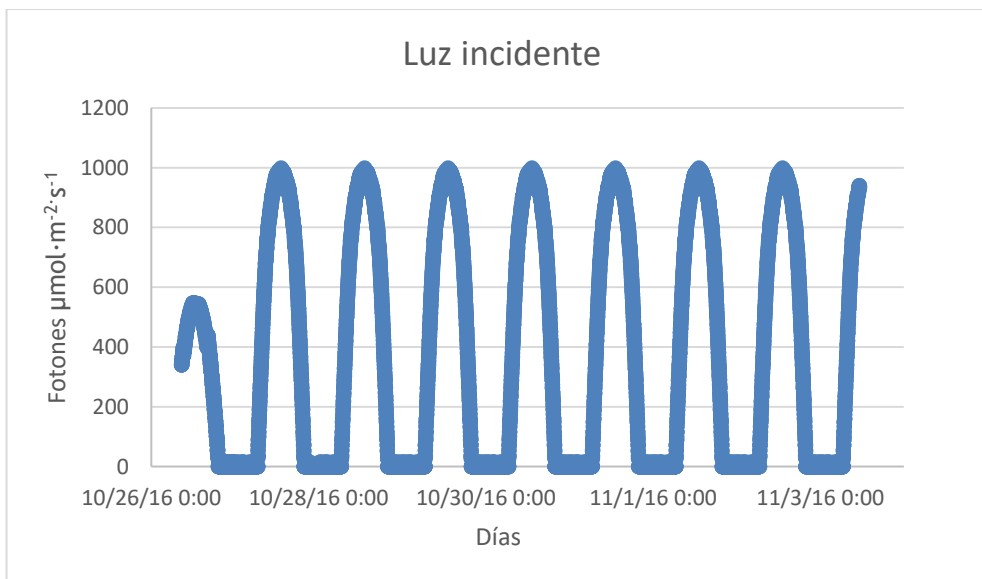
- Zekki, H., Gauthier, L. & Gosselin, A., 1996. Growth, Productivity, and Mineral Composition of Hydroponically Cultivated Greenhouse Tomatoes, with or without Nutrient Solution Recycling. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(6), pp.1082–1088. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/121/6/1082.short>.
- Zhang, Q., Zhan, J. & Hong, Y., 2015. The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of *Chlorella* sp. HQ. *Desalination and Water Treatment*, (August), pp.1–6. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19443994.2015.1038112>.
- Zheng, Z.C. et al., 2013. Accumulation characteristics of and removal of nitrogen and phosphorus from livestock wastewater by *Polygonum hydropiper*. *Agricultural Water Management*, 117, pp.19–25.
- Zitelli G., Biondi N., Rodolfi L. & Tedici M. 2013. Photobioreactors for mass production of microalgae. *Handbook of Microalgal Culture*. 2nd Edition. pp. 225-266.

ANEXOS

Curva de correlación luz Algaemist – fotones



Luz irradiada al reactor



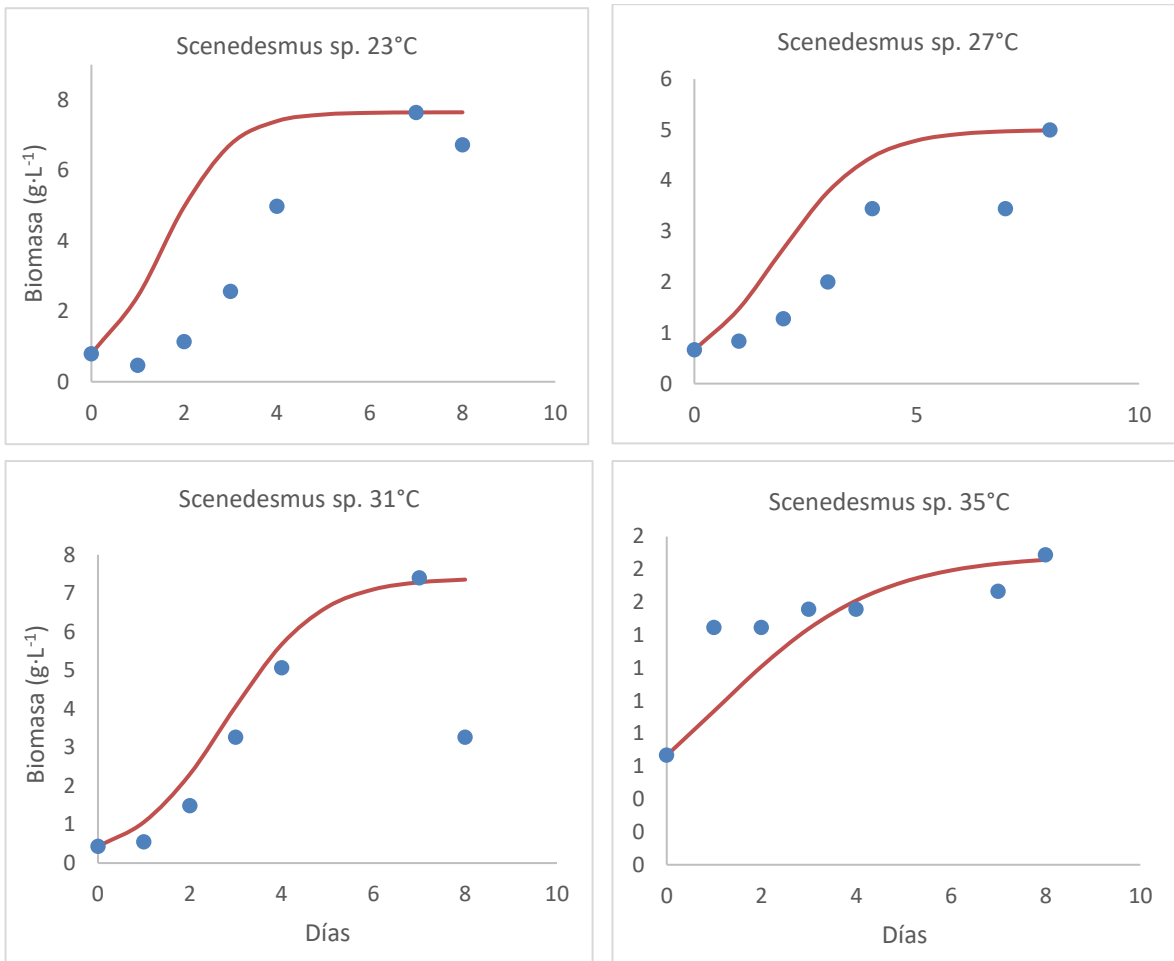
Modelo de Verlhust

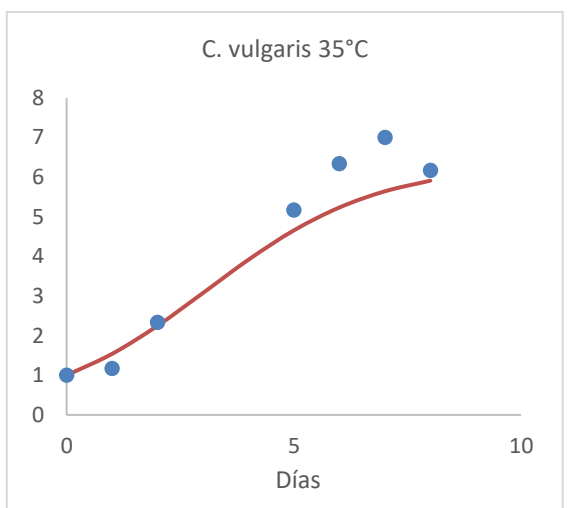
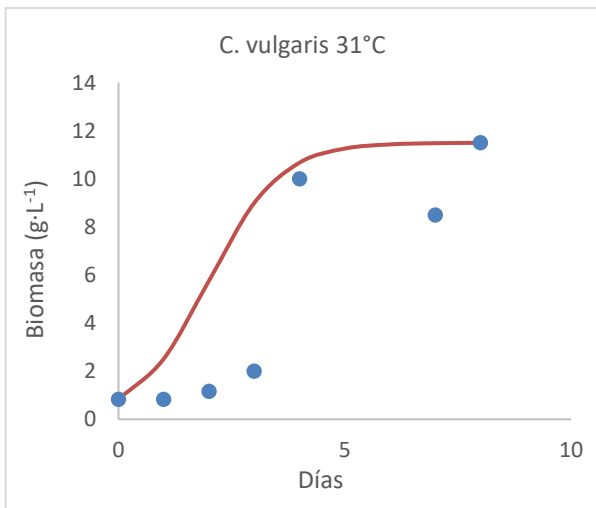
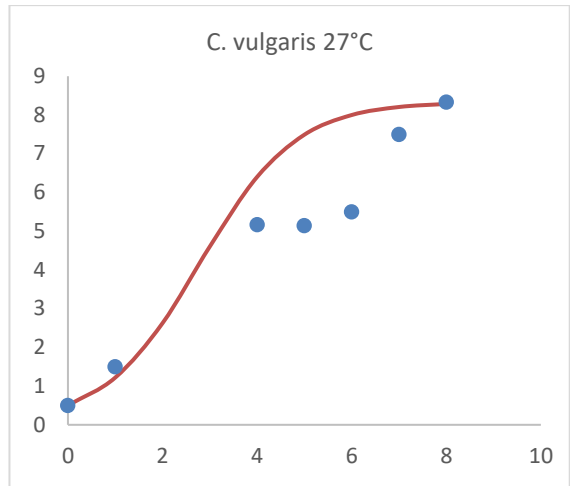
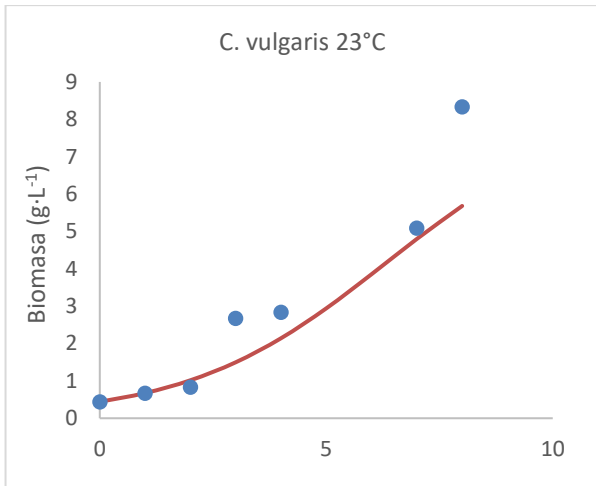
Se utilizó el modelo de Verlhust que predice el crecimiento de las microalgas para compararlo con los datos obtenidos experimentalmente.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (6)$$

Cuya forma derivada y simplificada queda de la siguiente manera (detallada en Gani et al. 2016):

$$X = \frac{X_0 \cdot X_m \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}}{X_m - X_0 + X_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}} \quad (7)$$





● g/L ● Verhulst