



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Boca del Río
División de Estudios de Posgrado e Investigación



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“CULTIVO DE MICROALGAS EN UN EFLUENTE RESIDUAL ACUÍCOLA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOMETANO”
TESIS**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ACUACULTURA

**PRESENTA
HILDA JANET SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ALFREDO ORTEGA CLEMENTE**

**CO- DIRECTOR
DRA. PAULA NATALIA ROBLEDO NARVÁEZ**

**ASESOR
DR. IGNACIO ALEJANDRO PÉREZ LEGASPI**

SEPTIEMBRE DEL 2023

BOCA DEL RIO, VERACRUZ.



Km. 12 Carretera Veracruz-Córdoba, Boca del Río, Ver. C.P. 94290.
Tel. (229) 690 5010 ext. 113 depi_bdelrio@tecnm.mx | tecnm.mx | bdelrio.tecnm.mx



2023
Francisco
VILLA
El revolucionario del pueblo

Boca del Río, Ver **5/SEPTIEMBRE/2023**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**HILDA JANET SÁNCHEZ SÁNCHEZ
PASANTE DEL PROGRAMA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN ACUACULTURA
PRESENTE**

De acuerdo con el fallo emitido por los integrantes del Comité Revisor de la TESIS PARA OBTENCIÓN DE GRADO, desarrollada por usted cuyo título es:

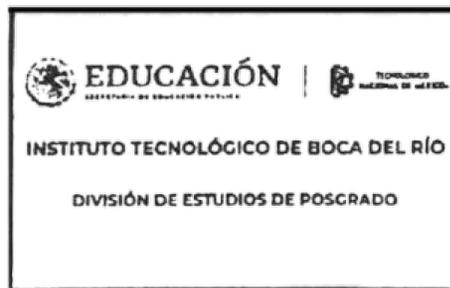
“CULTIVO DE MICROALGAS EN UN EFLUENTE RESIDUAL ACUÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMETANO”

Esta División de Estudios de Posgrado e Investigación le concede **AUTORIZACIÓN** para que proceda a su impresión.

ATENTAMENTE
*Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos*



**DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



c.c.p. Coordinación del Programa MCA
c.c.p. Expediente



LICENCIA DE USO OTORGADA POR Hilda Janet Sánchez Sánchez, de nacionalidad mexicana, mayor de edad, con domicilio Cantera N° 3, Col. Lomas del Pedregal, Santiago, San Lorenzo Cacaotepec, Oaxaca. En mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada: Cultivo de microalgas en un efluente residual acuícola para la producción de biometano. **“EL AUTOR Y/O EL TITULAR”**, a favor del Instituto Tecnológico de Boca del Río perteneciente al Tecnológico Nacional de México, la cual se registró por las cláusulas siguientes:

PRIMERA - OBJETO: **“EL AUTOR Y/O EL TITULAR”**, mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Boca del Río del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de **“LA OBRA”**, para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, este último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

SEGUNDA - TERRITORIO: La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

TERCERA - ALCANCE: La presente licencia contempla la autorización para uso de **“LA OBRA”** en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa, más no limitativa, a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse.

CUARTA - EXCLUSIVIDAD: La presente licencia de aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Boca del Río; por lo tanto, **“EL AUTOR Y/O TITULAR”** conserva los derechos patrimoniales y morales de **“LA OBRA”**, objeto del presente documento.

QUINTA - CRÉDITOS: El Instituto Tecnológico de Boca del Río y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el **“EL AUTOR Y/O TITULAR”** es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre **“LA OBRA”**; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

SEXTA - AUTORÍA: **“EL AUTOR Y/O TITULAR”** manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de **“LA OBRA”** y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable. Dado en la Ciudad, a los 12 días del mes de Septiembre del 2023.

“EL AUTOR Y/O TITULAR” “EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO”
Hilda Janet Sánchez Sánchez





ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Número Registro: **AC1-20-220110**

En la ciudad de Boca del Río, Ver., siendo las 10:00 horas del día 13 del mes de septiembre de 2023 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Consejo del Posgrado de la Maestría en Ciencias en Acuicultura del ITBOCA, para examinar la Tesis de Grado titulada:

"CULTIVO DE MICROALGAS EN UN EFLUENTE RESIDUAL ACUÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMETANO"

Que presenta el (la) alumno(a):

HILDA JANET SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Aspirante al Grado de:
Maestro en Ciencias en Acuicultura

Después de escuchar las opiniones sobre el documento escrito e intercambiar puntos de vista, los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para su defensa ante el jurado correspondiente.

LA COMISIÓN REVISORA:

DR. LUIS ALFREDO ORTEGA CLEMENTE
Director

DRA. PAULA NATALIA ROBLEDO NARVÁEZ
Co-Director

DR. IGNACIO ALEJANDRO PEREZ LEGASPI
Asesor

DRA. MARIA ISABEL JIMENEZ GARCIA
Asesor



Carta de originalidad y no plagio

El (La) que suscribe Hilda Janet Sánchez Sánchez, alumno(a) de la Maestría en Ciencias en Acuicultura, de la División de Estudios Posgrado e Investigación, del Tecnológico Nacional de México (TNM) Campus Instituto Tecnológico de Boca del Río y autor(a) de la tesis titulada:

“Cultivo de microalgas en un efluente residual acuícola para la producción de biometano.”,

Declaro que:

1. La tesis que presento ante la Maestría en Ciencias en Acuicultura, para la obtención del grado de Maestro(a) en Ciencias es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. La tesis ha sido revisada con la herramienta TURNITIN para certificar que no constituye un plagio, el reporte de Similitud del documento es de 13 % de coincidencia.
4. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad al Instituto Tecnológico de Boca del Río y al TNM de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de Boca del Río, a los 12 días del mes de septiembre del 2023.

Atentamente



Hilda Janet Sánchez Sánchez
Nombre y firma del estudiante

Vo. Bo.



Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente
Director de Tesis

RESUMEN

En esta investigación se realizó la remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y materia orgánica, así como la producción y productividad de microalgas en efluente residual acuícola, la biomasa de microalgas se utilizó para producir biometano. Se cultivaron las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloris oculata* en dos condiciones de irradiancia (40.5 y 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los resultados muestran un mayor crecimiento ($4.62 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5$ y $4.45 \times 10^7 \pm 2.33 \times 10^6$ cel mL^{-1}), producción (0.684 ± 0.124 y 0.718 ± 0.122 g L^{-1}) y productividad (0.043 ± 0.008 y 0.048 ± 0.008 g $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$) de biomasa con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente, en fase estacionaria a 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En la remoción de nitrato, fosfato y DQO, se alcanzaron remociones de 79.7-97 %, 25-50 % y 53-89 %, respectivamente, con ambas microalgas para ambas fases de crecimiento. Para el amonio y nitrito, las remociones más altas se obtuvieron a 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria, siendo para el amonio de 92.1 y 97%, con *N. oculata* y *C. vulgaris* respectivamente. Con el nitrito, las mayores remociones fueron de 79% (*N. oculata*) y 92 % (*C. vulgaris*). La combinación para remover mejor los contaminantes fue *N. oculata* a 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en fase estacionaria alcanzando remociones de 97.4 %, 57.5 %, 47 %, 50.4 % y 87.4 % de nitrato, nitrito, amonio, fosfato y DQO, respectivamente. Se encontró que la microalga que más lípidos produce (26-28%) es *N. oculata* en las dos fases de crecimiento con las dos condiciones de iluminación. En la producción de proteína, se encontró que las dos microalgas utilizadas producen más proteína a 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase exponencial alcanzando 29.8% (*C. vulgaris*) y 30.4% (*N. oculata*). Con carbohidratos el porcentaje más alto (41.9%) se obtuvo con *C. vulgaris* a 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase exponencial. En la producción de biometano se alcanzaron producciones mayores a 1696.72 mL CH_4 g SV^{-1} con todos los sustratos probados, encontrando diferencia significativa entre el tipo de sustrato utilizado, siendo el mejor la biomasa de *C. vulgaris*, con la cual se alcanzaron rendimientos de 2613.95 mL CH_4 g SV^{-1} (*C. vulgaris* EXP) y 2014.74 mL CH_4 g SV^{-1} (*C. vulgaris* EST). Para evaluar comportamiento cinético de la

producción de biometano se utilizó el modelo de Gompertz modificado, obteniendo un excelente ajuste. En cuanto al balance energético, este fue negativo.

Palabras clave: remoción, microalgas, efluente residual acuícola, irradiancia.

ABSTRACT

In this investigation, the removal of nitrogenous compounds, phosphates and organic matter was carried out, as well as the production and productivity of microalgae in residual aquaculture effluent, the biomass of microalgae was used to produce biomethane. The microalgae *Chlorella vulgaris* and *Nannochloris oculata* were cultured under two irradiance conditions (40.5 and $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The results show higher growth ($4.62 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5$ and $4.45 \times 10^7 \pm 2.33 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), production (0.684 ± 0.124 and $0.718 \pm 0.122 \text{ g L}^{-1}$) and productivity (0.043 ± 0.008 and $0.048 \pm 0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) of biomass with *C. vulgaris* and *N. oculata*, respectively, in stationary phase at $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In the removal of nitrate, phosphate and COD, removals of 79.7-97 %, 25-50 % and 53-89 %, respectively, were achieved with both microalgae for both growth phases. For ammonium and nitrite, the highest removals were obtained at $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the stationary phase, being 92.1 and 97% for ammonium, with *N. oculata* and *C. vulgaris* respectively. With nitrite, the highest removals were 79% (*N. oculata*) and 92% (*C. vulgaris*). The combination to best remove contaminants was *N. oculata* at $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in stationary phase reaching removals of 97.4 %, 57.5 %, 47 %, 50.4 % and 87.4 % of nitrate, nitrite, ammonium, phosphate and COD, respectively. It was found that the microalgae that produced the most lipids (26-28%) was *N. oculata* in the two growth phases with the two lighting conditions. In protein production, it was found that the two microalgae used produce more protein at $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in exponential phase, reaching 29.8% (*C. vulgaris*) and 30.4% (*N. oculata*). With carbohydrates, the highest percentage (41.9%) was obtained with *C. vulgaris* at $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in exponential phase. In the production of biomethane, productions greater than $1696.72 \text{ mL CH}_4 \text{ g SV}^{-1}$ were reached with all the substrates tested, finding a significant difference between the type of substrate used, the best being the biomass of *C. vulgaris*, with which yields of $2613.95 \text{ mL CH}_4 \text{ g SV}^{-1}$ (*C. vulgaris* EXP) and $2014.74 \text{ mL CH}_4 \text{ g SV}^{-1}$ (*C. vulgaris* EST). To evaluate the kinetic behavior of biomethane production, the modified Gompertz

model was used, obtaining an excellent fit. Regarding the energy balance, it was negative.

Keywords: removal, microalgae, aquaculture residual effluent, irradiance.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi familia por todo su apoyo y amor.

AGRADECIMIENTOS

Al TecNM por la formación como Maestro en Ciencias y por el financiamiento del proyecto “Producción de biogás a partir de biomasa microalgal como sustrato, alternativa sustentable para la producción de bioenergía” clave: 14384.22-P. A CONAHCYT por la beca otorgada con número de becario 804403.

A la hermosa familia que tengo por acompañarme en esta etapa y a mi madre por siempre apoyarme, así mismo, quiero agradecer a Alejandra Torres Ariño por el ánimo brindado en todo momento.

Al Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente por permitirme trabajar bajo su dirección, por compartir su conocimiento, su paciencia y dedicación, externo mi agradecimiento a la Dra. Paula Natalia Robledo Narváez y al Dr. Alejandro Pérez Legaspi por apoyar este trabajo.

A las maestras Dulce María Barradas Dermitz, Anilú Miranda Medina y Georgina Luna Carrillo, integrantes del Cuerpo Académico Ciencia e Ingeniería de Compuestos Bioactivos y del Programa Multidisciplinario de Investigación en Ambiente-Energía del Instituto Tecnológico de Veracruz por las facilidades brindadas y por el acompañamiento en todo el proceso para realizar la segunda etapa de esta investigación.

A mis compañeros, quienes me apoyaron en las diferentes actividades realizadas: a Lore, Flor, Manuel, Ángel, Tonatiuh y al técnico Andrés, y a las residentes del ITVER Sheila, Gema, Aris y a los que directa e indirectamente contribuyeron.

CONTENIDO (ÍNDICE)

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Efluentes residuales acuícolas (ERA)	4
2.2 Tratamientos de efluentes residuales acuícolas	5
2.3 Efluentes de tilapia	6
2.4 Microalgas	8
2.4.1 Asimilación de nutrientes	10
2.4.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	13
2.4.3 <i>Nannochloropsis oculata</i>	15
2.5 Biogás	17
2.5.1 Producción de biogás	18
2.5.2 Inóculos bacterianos	20
2.5.3 Pretratamiento del sustrato (biomasa de microalgas)	20
2.6 Utilización de las microalgas en el tratamiento de aguas	22
2.7 Cinética de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	24
2.8 Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatados y materia orgánica.	25
2.9 Análisis bioquímico	28
2.10 Biogás producido en diferentes ensayos e inóculos bacterianos utilizados	30
2.11 Modelos cinéticos aplicados en la digestión anaerobia (DA)	36
2.12 Balance energético	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
6. ÁREA DE ESTUDIO	42

7. MATERIALES Y MÉTODOS	44
7.1 Diseño experimental	44
7.2 Desarrollo experimental	46
7.3 Etapa I. Caracterización del efluente y cultivo de microalgas	46
7.3.1 Caracterización y elección del efluente acuícola	46
7.3.2 Cultivo de microalgas.	48
7.3.3 Determinación de las fases de crecimiento.	49
7.3.4 Cultivo de microalga en fotobiorreactores de 6 L para determinación de eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados y composición bioquímica	50
7.3.5 Determinación del contenido, producción y productividad de biomasa.	54
7.3.6. Análisis bioquímico	55
7.3.6.1 Determinación de lípidos por el Método Soxhlet	55
7.3.6.2 Determinación de proteínas	57
7.3.6.3 Determinación de carbohidratos	61
7.3.7 Producción de biomasa	64
7.4 Etapa II. Producción de biometano	65
7.4.1 Inóculo bacteriano	65
7.4.2 Caracterización del sustrato e inóculo	66
7.4.3 Pretratamiento del sustrato (biomasa microalgal)	68
7.4.4 Digestión anaerobia	69
7.4.5 Potencial bioquímico de metano (PBM) teórico	71
7.4.6 Biodegradabilidad	72
7.4.7 Ajuste al Modelo de Gompertz modificado	72
7.4.8. Balance energético	73
7.4.9 Análisis estadístico	74
8. RESULTADOS	75
8.1 Efluente residual	75
8.2 Cinética de crecimiento	75
8.3 Producción y productividad de biomasa de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	80

8.4 Eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados en cultivos microalgales.	84
8.4.1 Nitrato	86
8.4.2 Nitrito	88
8.4.3 Amonio	89
8.4.4 Fosfato	91
8.4.5 Demanda química de oxígeno (DQO)	92
8.5 Composición bioquímica de las microalgas <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	94
8.5.1 Lípidos	94
8.5.2 Proteína	95
8.5.3 Carbohidratos	97
8.6 Producción de CH ₄ durante la digestión anaerobia en condición mesofílica.	100
8.6.1 Ajuste al Modelo de Gompertz modificado	101
8.6.2 Potencial bioquímico de metano teórico	103
8.6.3 Balance energético	104
9. DISCUSIONES	105
9.1 Efluente residual	105
9.2 Cinética de crecimiento y densidad celular	105
9.3 Producción y productividad de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Nannochloris oculata</i> .	107
9.4 Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y materia orgánica.	109
9.5 Análisis bioquímico	112
9.6 Producción de biometano	114
10. CONCLUSIONES	118
11. LITERATURA CITADA	119
12. ANEXO A. MEDIO BASAL BOLD (MBB)	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia (Abbasi <i>et al.</i> , 2012).	19
Tabla 2. Rutas y reacciones para producir metano (Abbasi <i>et al.</i> , 2012).	19
Tabla 3. Diseño para las cinéticas de crecimiento.	44
Tabla 4. Diseño experimental para el cultivo de microalgas.	45
Tabla 5. Diseño experimental para la digestión anaerobia.	45
Tabla 6. Reactivos utilizados para medir los parámetros nitrito, amonio, nitrato, fosfato y DQO	52
Tabla 7. Elaboración de la curva de calibración de proteínas.	57
Tabla 8. Curva de calibración de carbohidratos utilizando Glucosa Anhidra.	61
Tabla 9. Datos de caracterización empleados para la base de cálculo.	68
Tabla 10. Datos utilizados en la ultrasonicación.	69
Tabla 11. Cantidad de sustrato e inóculo.	69
Tabla 12. Número de moles	71
Tabla 13. Parámetros del efluente crudo y estéril.	75
Tabla 14. Análisis de varianza de densidad celular de las microalgas <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	78
Tabla 15. Densidad celular de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> en dos condiciones de irradiancia, dos medios de cultivo y dos fases de crecimiento.	79
Tabla 16. Análisis de varianza de la producción de biomasa.	80
Tabla 17. Resultados del ANOVA de la productividad de biomasa.	82
Tabla 18. Producción y productividad de biomasa en <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	83
Tabla 19. Análisis de varianza de la remoción del nitrato con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	87

Tabla 20. Análisis de varianza de la remoción del nitrito con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	88
Tabla 21. Análisis de varianza de la remoción del amonio, con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	90
Tabla 22. Análisis de varianza de la remoción del fosfato, con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	91
Tabla 23. Análisis de varianza de la remoción del DQO, con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> en dos condiciones de iluminación en dos fases de crecimiento.	93
Tabla 24. Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatados y materia orgánica.	94
Tabla 25. Análisis de varianza sobre la producción de lípidos de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	94
Tabla 26. Análisis de varianza sobre la producción de proteínas de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	96
Tabla 27. Análisis de varianza sobre la producción de carbohidratos de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i>	98
Tabla 28. Porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos en <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	99
Tabla 29. Producción de biometano con dos tipos de sustratos (Microalgas)	100
Tabla 30. Constantes de Gompertz modificado.	101
Tabla 31. Análisis de varianza de la producción de biometano.	102
Tabla 32. Potencial bioquímico de metano teórico del perfil bioquímico de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	104
Tabla 33. Biodegradabilidad de los sustratos utilizados.	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 1 Metabolismo del nitrógeno (Fuente: Chow <i>et al.</i> 2012).	11
Fig. 2 Representación esquemática de una trama trófica del sistema marino, adicionando procesos de incorporación de nutrientes inorgánicos disueltos y transformación a materia orgánica particulada (MOP) vía reacciones metabólicas enzimáticas (RE) de los productores primarios (Fuente: Iriarte <i>et al.</i> 2007).	12
Fig. 3 <i>Chlorella sp</i> (Fuente: Kanna <i>et al.</i> , 2021).	15
Fig. 4 <i>Nannochloropsis sp</i> (Fuente: Kanna <i>et al.</i> , 2021).	16
Fig. 5 Clasificación propuesta para el pretratamiento de microalgas para digestión anaeróbica producción de biogás (Córdova <i>et al.</i> , 2017).	21
Fig. 6 Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías.	43
Fig. 7 Área destinada al proyecto biogás biometano del Laboratorio de Ecología y química del ITVER.	43
Fig. 8 A) Efluente residual de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> (ETE1), B) Efluente crudo 2 de <i>O. niloticus</i> rocky mountain var. Blanca (ETE2).	47
Fig. 9 A) Bidón con efluente, B) Sedimentación, C) Retiro de materia orgánica/microalgas, D) Filtro, E) Efluente filtrado y esterilizado.	48
Fig. 10. Mantenimiento y propagación de cepas	49
Fig. 11 Cinéticas de crecimiento A) <i>Chlorella vulgaris</i> , B) <i>Nannochloris oculata</i> .	50
Fig. 12 Cultivo de microalgas en fotobiorreactores de 6 L.	51
Fig. 13 Procedimiento para calcular la eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y DQO. A) Cosecha, B) Centrifuga, C) Sobrenadante y D) Medición de parámetros.	53
Fig. 14 Proceso para la determinación de peso seco, A) muestras, B) Centrifuga, C) Filtrado, D) Biomasa seca.	54
Fig. 15 Curva de calibración de proteínas utilizando la absorbancia (595 nm) como variable dependiente.	58

Fig. 16 Muestra de los tubos de ensayo para la calibración de proteínas.	58
Fig. 17 Procedimiento para el cálculo de proteínas. A) Baño María, B) Microalgas después de la incubación a 100°C, C) Sonicador, D) Centrífuga, E) microalgas con la solución de Bradford, F) espectrofotómetro.	60
Fig. 18 Curva de calibración de carbohidratos utilizando la absorbancia (315 nm) como variable dependiente.	61
Fig. 19 Tubos de ensayo de la calibración de carbohidratos.	62
Fig. 20 Cálculo de carbohidratos. A) Microalga con H ₂ SO ₄ 1M, B) Sonicador, C) Baño María a 100°C, D) Microalgas después de la incubación a 100°C, E) Baño María a 90°C, F) Espectrofotómetro.	63
Fig. 21 Cultivo de microalgas en fotobiorreactores de 200 L.	64
Fig. 22 Microalga concentrada.	65
Fig. 23 Lodo procesado de una fermentación de excreta de cerdo.	65
Fig. 24 A) y B) Microalga, C) Crisol con microalga diluida, D) Crisol con cenizas.	66
Fig. 25 Mezcla de sustrato e inóculo.	70
Fig. 26 Equipo AMPTS II Light.	70
Fig. 27 Cinética de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> , a) 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, b) 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y c) Efluente.	77
Fig. 28 Representación gráfica del análisis de densidad celular en fase estacionaria.	79
Fig. 29 Efectos principales en la producción de biomasa.	81
Fig. 30 Efecto de la combinación Microalga*irradiancia sobre la productividad de biomasa de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	82
Fig. 31 Comportamiento dinámico de la concentración de a) nitrato, b) nitrito, c) amonio con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> cultivadas en efluente a 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	85

Fig. 32 Comportamiento dinámico de la concentración de a) nitrato, b) nitrito, c) amonio con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> cultivadas en efluente a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	85
Fig. 33 Comportamiento dinámico de la concentración de a) fosfato y b) DQO con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> cultivadas en efluente a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	86
Fig. 34 Comportamiento dinámico de la concentración de a) fosfato y b) DQO con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> cultivadas en efluente a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	86
Fig. 35. Efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento sobre la remoción del nitrato en <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	87
Fig. 36 Efecto de la combinación de factores Microalga *Irradiancia*Fase de crecimiento en la remoción del nitrito.	89
Fig. 37 Efecto de la combinación Fase de crecimiento*Irradiancia sobre la remoción del amonio con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> .	90
Fig. 38 Efecto de la combinación Fase de crecimiento*Irradiancia sobre la remoción del fosfato.	92
Fig. 39 Efecto de la irradiancia sobre la remoción del DQO.	93
Fig. 40 Efecto del tipo de microalgas en la producción de lípidos.	95
Fig. 41 Efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento sobre la producción de proteínas de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> . a) Efecto de la Microalga e irradiancia, b) Efecto de la Microalga y fase de crecimiento.	97
Fig. 42 Efecto de la Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento sobre la producción de carbohidratos.	98
Fig. 43 Producción de biometano con <i>C. vulgaris</i> y <i>N. oculata</i> como sustrato.	100
Fig. 44 Rendimiento diario de metano.	101
Fig. 45 Ajuste de la producción de biometano al Modelo de Gompertz modificado.	102
Fig. 46 Efecto del tipo de microalga en la producción de biometano. Cv: <i>C. vulgaris</i> , No: <i>N. oculata</i> .	103

1. INTRODUCCIÓN

Los efluentes residuales acuícolas (ERA), producto de la intensificación de la acuicultura requieren ser dispuestos de manera más sostenible ahorrando recursos en su procesamiento y de ser posible, obtener compuestos de alto valor con el reciclaje de nutrientes y de los subproductos (Campanati *et al.* 2022). Los ERA tienen una composición similar, aunque existen diferencias en la calidad y cantidad de componentes según la ubicación, las especies cultivadas y las prácticas de cultivo adoptadas. En general, contienen alimento no consumido y heces que pueden representar un 30 % del alimento seco no consumido y un 30 % de alimentos consumidos que se ingieren como heces (Chatla *et al.* 2020), además de sólidos de fuentes externas, crecimiento de microalgas y bacterias (Chadwick *et al.* 2014). Los sistemas de cultivo que más efluentes producen son los sistemas semi-intensivos e intensivos, ya que utilizan más insumos, por lo tanto producen más desechos sólidos y nutrientes que probablemente causen efectos tóxicos agudos y riesgos ambientales a largo plazo (Chatla *et al.* 2020), como la eutrofización (Martínez-Cordero *et al.* 2021; Hernández-Pérez y Labbé, 2014), eventos hipóxicos y acidificación del agua (Campanati *et al.* 2022). Es por ello, que evitar y mitigar la introducción de efluentes nocivos en el medio ambiente debe ser clave en el desarrollo de la acuicultura industrial intensiva para minimizar los impactos de la contaminación (Li *et al.* 2020). Se preve que la población aumentará a 9.7 billones para el 2050 (UN, 2022), por lo que, además de intensificar los cultivos y demandar más agua, el mismo crecimiento poblacional y el cambio climático provocan una creciente escasez de agua (Martínez-Cordero *et al.* 2021), espacio y alimento (Campanati *et al.* 2022). Agregando que en 2019, la ONU lanzó una campaña mundial sobre la gestión sostenible de nitrógeno, y estableció el objetivo de reducir a la mitad los residuos para 2030, se trata también de aumentar los sistemas de tratamiento y aumentar la recuperación del agua, en caso de moverse a una economía más circular (Sealy, 2021), en México se ha establecido la NOM-001-SEMARNAT-2021 (SEMARNAT, 2022), que establece el

límite máximo permisible de N total hacia ríos, arroyos y canales de 25, 30 y 35 mg L⁻¹ y de P total de 15, 18 y 21 mg L⁻¹, respectivamente.

Algunos de los tratamientos utilizados en acuicultura son: remoción de sólidos por sedimentación y filtración mecánica, tratamiento extractivo con microalgas (Chadwick *et al.* 2014), humedales (Lin *et al.* 2002, Hu *et al.* 2017), algunas técnicas se abordan desde las descargas durante la limpieza y cosecha mediante áreas de infiltración con vegetación o riego de cultivos (Yeo *et al.* 2004), mientras que otros métodos potenciales para mitigar la contaminación y que presentan altos costos de inversión iniciales y consumo de energía, son: los sistemas de recirculación acuícola (RAS, por sus siglas en inglés) efectivo en interiores y cultivos en laboratorios; la acuicultura integral multitrófica (AMTI), que integra especies de diferente nivel trófico o nutritivo; la técnica de biofloc, que implica la manipulación de la relación C/N para convertir los desechos nitrogenados tóxicos en proteína microbiana útil (Chatla *et al.* 2020). Uno de los efluentes al cual poner especial atención es a los producidos por los cultivos de tilapia, que al ser un organismo con rápido crecimiento y adaptabilidad a los diferentes hábitats, es uno de los cuatro grupos de especies más producidos a nivel mundial (Martínez-Cordero *et al.* 2021) y el segundo más cultivado en México. Una alternativa de tratamiento de estos efluentes se encuentra dentro de la misma acuicultura con las microalgas, microorganismos fotosintéticos autótrofos que tienen capacidad ficorremediadora por lo que pueden incorporar contaminantes del medio líquido o gaseoso mediante la biotransformación (Hernández-Pérez y Labbé, 2014), realizando el reciclaje de nutrientes y favoreciendo la formación de algunos compuestos, como lo observado con *Nannochloris maculata* que produce más lípidos en efluentes de camarón que en medio convencional (Conway) (Campanati *et al.* 2022). El mismo comportamiento ha sido observado en la remoción de contaminantes como el cobre (Martínez-Macias *et al.* 2019, Aguilar-Ruiz *et al.* 2020), por lo que la biomasa producida puede ser dirigida a otras industrias para la extracción de compuestos de alto valor o para los biocombustibles (Campanati *et al.* 2022). Aunque, la producción de biomasa todavía presenta una serie de

dificultades que se deben mejorar para aumentar su rentabilidad (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Una alternativa viable en la producción de microalgas es realizar el cultivo durante el proceso de tratamientos de aguas residuales en las fases: secundaria y terciaria (Gonzalez-Calzada, 2016; Flores-Salgado *et al.* 2020) o en los efluentes de acuicultura (Calderini *et al.*, 2021; Pérez-Legaspi *et al.* 2019). Así mismo, ya se han realizado estudios en la producción de biocombustibles (Bellou *et al.* 2014) como el biodiésel (Bellou *et al.* 2014), bioetanol (Rizza *et al.* 2019) y biogás, para hacer frente a la crisis energética, debido a la disminución de los combustibles fósiles (Zabed *et al.* 2020); así también, se establece en La Ley para la Transición Energética (LTE) que para el 2024 se genere el 35 % de energía eléctrica de fuentes no fósiles (Programa Sectorial de Energía 2020-2024). El biogás, es un biocombustible que puede utilizarse desde la combustión directa, la cogeneración de energía eléctrica y térmica, generación eléctrica con motores, generación eléctrica con celdas de combustible, y al ser purificado a biometano puede inyectarse en redes de distribución de gas o como combustible vehicular (FAO, 2019).

En la presente investigación se aprovecharán los efluentes de cultivos experimentales de tilapia de la zona centro del estado de Veracruz, específicamente del Instituto Tecnológico de Boca del Río (ITBOCA) para aplicar la tecnología del cultivo de microalgas, y utilizar la biomasa como sustrato en la producción de biogás, ofreciendo una alternativa de tratamiento a los productores con un potencial beneficio: ambiental, económico y social.

2. ANTECEDENTES

2.1 Efluentes residuales acuícolas (ERA)

Los efluentes residuales acuícolas (ERA) han aumentado por los cambios que ha sufrido la acuicultura, de ser estrictamente familiar a ser una industria de lucro (Ferrer-Álvarez *et al.*, 2015), además ha pasado a ser el sector de producción de alimentos que más rápido crece en el mundo debido a que el consumo de pescado ha aumentado a un ritmo dos veces superior al crecimiento demográfico (FAO, 2021) y se prevé que siga aumentando por el crecimiento poblacional que se espera, alcance los 9.7 billones de personas para el 2050 (UN, 2022), por lo tanto se intensificarán los cultivos y con ello se tendrán mayores impactos ambientales (FAO, 2021). Es por ello, que las acciones para mitigar el impacto deben preverse desde la producción con fuentes sostenibles de piensos y buenas prácticas acuícolas para reducir las emisiones de efluentes nocivos en el medio ambiente (Li *et al.* 2020).

En general, las aguas producidas por acuicultura tienen una composición similar, aunque existen diferencias en la calidad y cantidad de componentes según la ubicación, las especies cultivadas y las prácticas de cultivo adoptadas (Chatla *et al.* 2020). Los desechos en los criaderos o granjas de acuicultura se pueden clasificar como: (1) alimentos residuales y materia fecal; (2) subproductos metabólicos; (3) residuos de biocidas y biostatos; (4) desechos derivados de fertilizantes; (5) desechos producidos durante la muda y descomposición de organismos muertos y (6) el colapso de las floraciones de algas. Sin embargo, las aguas residuales contienen principalmente alimento no consumido y heces que pueden representar un 30 % del alimento seco no consumido y un 30 % de alimentos consumidos que se ingieren y son excretados (Chatla *et al.* 2020).

Los sistemas de cultivo semi-intensivos e intensivos utilizan más insumos, por lo tanto producen más desechos sólidos y nutrientes que probablemente causen efectos tóxicos agudos y riesgos ambientales a largo plazo (Chatla *et al.* 2020), como la eutrofización (Martínez-Cordero *et al.* 2021; Hernández-Pérez y Labbé, 2014) que es provocada por el aumento de desechos nitrogenados y fosfatados (Chatla *et al.* 2020; Yeo *et al.* 2004), además de eventos hipóxicos y acidificación del agua (Campanati *et al.* 2022).

2.2 Tratamientos de efluentes residuales acuícolas

Para remover los sólidos suspendidos y los nutrientes disueltos originados principalmente del alimento no consumido, las heces de los peces, los sólidos de fuentes externas, el crecimiento de microalgas y bacterias se utilizan dos métodos: a) sedimentación y b) filtración mecánica. En la sedimentación se emplean los sistemas de asentamiento gravitacional de diferente complejidad, este método emplea la fuerza de gravedad para extraer las partículas de un fluido. En la filtración mecánica los filtros mecánicos remueven los sólidos del agua usando barreras físicas a través de los cuales las partículas sólidas no pueden pasar, teniendo en cuenta los requerimientos energéticos para la operación del filtro (Chadwick *et al.* 2014). Sourget *et al.* (2014) menciona que, es probable que en el futuro la piscicultura se realice solo en agua de mar por la disminución del agua dulce, por lo que es necesario integrar tratamientos extractivos con algas o plantas en general.

Cultivo de algas. Las algas emplean la energía solar para convertir los nutrientes presentes en los efluentes en recursos útiles, mediante el proceso de la fotosíntesis (Sourget *et al.* 2014).

Humedales artificiales. Pueden remover cantidades significativas de sólidos suspendidos, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, elementos trazas y

microorganismos presentes en los efluentes municipales, industriales y de las operaciones de ganadería (Lin *et al.* 2002; Hu *et al.* 2017).

Otras técnicas para el tratamiento de efluentes acuícolas se pueden implementar desde las descargas durante la limpieza y la cosecha, que se abordan mediante el desvío del flujo con uso de humedales artificiales, áreas de infiltración con vegetación y riego de cultivos (Yeo *et al.* 2004). Aunado a esto, se han implementado otros métodos potenciales para mitigar la contaminación y que presentan altos costos de inversión iniciales y consumo de energía, como los sistemas de recirculación acuícola (RAS, por sus siglas en inglés) efectivo en interiores y cultivos en laboratorios; la acuicultura integral multitrófica (IMTA, por sus siglas en inglés), que integra especies de diferente nivel trófico o nutritivo; la técnica de biofloc, que implica la manipulación de la relación C/N para convertir los desechos nitrogenados tóxicos en proteína microbiana útil (Chatla *et al.* 2020). El policultivo es una manera de intensificar la piscicultura sin un consumo de alimento costoso con organismos de hábitos alimentarios complementarios o compatibles de peces de que no compiten entre sí, siendo el método de cultivo más noble porque se mejoran continuamente las condiciones ecológicas del estanque (FAO, 1979). Actualmente se están utilizando bivalvos de agua dulce, en maricultura se integran bivalvos y algas (especies extractivas), que además de disminuir la carga de nutrientes, aumenta la productividad y se utiliza más eficientemente el recurso. Cabe mencionar que la producción de especies extractivas representó el 57.4% del total de la producción acuícola mundial en 2018 (FAO, 2020).

2.3 Efluentes de tilapia

La tilapia (*Oreochromis sp.*) es una especie de pez rentable para la acuicultura debido a su rápido crecimiento, resistencia a enfermedades, baja tasa de mortalidad, tolerancia a condiciones de alta densidad, resistencia a bajas

concentraciones de oxígeno y flexibilidad en la aceptación del alimento. (Guzmán-Luna *et al.* 2021). Se cultiva en más de 120 países, siendo México el décimo tercer país con el cultivo más alto (Martínez-Cordero *et al.* 2021).

En México, la acuicultura de tilapia se practica ampliamente y contribuye al 91% de la producción acuícola total, cultivándose mayormente en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Chiapas. De las desventajas que se tienen al cultivar tilapia es la huella hídrica, debido al agua que se requiere y porque la mayoría de las fincas no tratan sus aguas residuales, lo que impacta de forma negativa en el ambiente pues contienen desechos provenientes de los insumos utilizados como los fertilizantes y alimentos acuícolas, aunque algunas las reutilizan para la agricultura (Guzmán-Luna *et al.* 2021). En México, se tiene el problema de la escasez de agua debido al cambio climático y el crecimiento de la población (Martínez-Cordero *et al.* 2021), por lo que los agricultores necesitarán más agua para compensar las crecientes pérdidas por evaporación debido al clima más cálido. Aunado a esto, en muchos lugares, el agua superficial está contaminada (Guzmán-Luna *et al.* 2021). Por tal motivo, se espera que los productores de tilapia tengan menos agua disponible para sus operaciones y a un costo más alto, lo que tiende a conducir a una menor rentabilidad en el cultivo (Martínez-Cordero *et al.* 2021).

Es por estas dos razones (la creciente escasez y contaminación del agua) que se están desarrollando tecnologías de ahorro de agua en los sistemas de cultivo, como los sistemas de recirculación de acuicultura (RAS), los cultivos en biofloc y los sistemas de canalizaciones en estanques (IPRS) (Martínez-Cordero *et al.* 2021), así como los métodos para el reciclaje de nutrientes tanto establecidos como emergentes son necesarios para hacer una industria más sostenible (Campanati *et al.* 2022).

2.4 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eucariotas que pueden contribuir entre el 40 - 50% del oxígeno de la atmósfera y vivir en ambientes extremos tanto acuáticos como terrestres (Vanegas y Hernández-Benítez, 2018). Se consideran los principales productores de oxígeno, son el origen de la transformación atmosférica (fijación de CO₂ y liberación de O₂) (Tebanni *et al.* 2020), además de su condición de productores primarios, regulan el régimen gaseoso y tienen acción depuradora, por lo que son consideradas como uno de los indicadores más importantes de las alteraciones del medio marino (Vanegas y Hernández-Benítez, 2018). Por lo tanto, cuando un sistema recibe un exceso de materia orgánica, nitrógeno y fósforo modifica la estructura, función y productividad del sistema alterando la composición de la comunidad de microalgas (Vanegas y Hernández-Benítez, 2018) y afectando a los organismos que habitan en el mismo ambiente. La capacidad que tienen las microalgas para adaptarse y sobrevivir, les permite colonizar todo tipo de ambientes, encontrándolas de esta manera en aguas termales, en el hielo, aguas ácidas o hipersalinas, en cuevas asociadas en forma de simbiosis con todo tipo de organismos. Algunas especies pueden soportar temperaturas muy bajas o paradójicamente extremas (Tebanni *et al.* 2020).

Desde el siglo XX se inició con el desarrollo sistemático de las aplicaciones de las microalgas y han tenido un amplio rango de aplicaciones desde la nutrición para humanos como para animales (Bellou *et al.* 2014), utilizándose entera o extrayendo los compuestos que producen. En el ámbito ambiental, las microalgas han mostrado mitigar el efecto invernadero por las altas tasa de captura de CO₂, y biorremediar las aguas contaminadas provenientes de las industrias, por su capacidad de absorción de metales pesados y fósforo (Vanegas y Hernández-Benítez, 2018). Si bien la mediana complejidad de la ficorremediación, la convierte en una técnica atractiva como fuente de nutrientes y/o CO₂, su asociación a

procesos productivos de biomasa aún presenta una serie de dificultades que se deben mejorar, como la relación costo/eficiencia en los actuales sistemas de separación de la biomasa (Hernández-Pérez y Labbé, 2014), ya que esta separación (sólidos de líquidos) es un proceso que cubre alrededor del 30% del costo total de producción (Bellou *et al.* 2014).

Una alternativa viable en la producción de microalgas es cultivarla durante el proceso de tratamientos de aguas residuales en la fase secundaria y terciaria (Gonzalez-Calzada, 2016; Flores-Salgado *et al.* 2020) o de los efluentes de acuicultura (Calderini *et al.* 2021; Pérez-Legaspi *et al.* 2019), tomando en cuenta las especies que mejor se desarrollan en estos medios de cultivo. Recalcando las ventajas que nos ofrecen las microalgas desde una perspectiva industrial, debido a la simplicidad de su cultivo, mayor eficiencia fotosintética y tasas de crecimiento, mayor productividad de biomasa y aceite en comparación con las plantas terrestres que puede llegar a 200 veces la de los aceites vegetales comunes, por lo que resulta una fuente atractiva de materia prima para la producción de biodiesel, aunque producido con microalgas todavía es más caro que el producido por las plantas convencionales, mientras que el combustible fósil es mucho más barato (Bellou *et al.* 2014). En cuanto a los métodos de recolección se incluyen varios: floculación o coagulación, flotación, filtración, sedimentación y centrifugación (Chen *et al.* 2011). La elección del método apropiado debe considerarse de acuerdo con la densidad de las células de cultivo, el tamaño de las células de microalgas, el producto objetivo, etc., (Bellou *et al.* 2014). El sistema de cultivo dependerá de la especie de microalga a utilizar; así como del producto final que se quiera obtener. Los nutrientes que se necesitan en mayor proporción o macronutrientes son nitrógeno, fósforo y sílice, en el caso de las diatomeas.

2.4.1 Asimilación de nutrientes

Paes *et al.* (2016) menciona que las microalgas tienen una tendencia natural de captar grandes cantidades de nitrógeno inorgánico disuelto en el medio, por lo que acumulan altas concentraciones de reservas inorgánicas de nitrógeno (nitrato, nitrito y amoníaco/amonio) en la fase exponencial, lo que refleja la rápida absorción de nitrógeno en los primeros días de crecimiento, cuando ningún factor es limitante. Oscanoa-Huaynate *et al.* (2021) y Medina-Aguilar, (2016) mencionan que la microalga tiene un orden para asimilar los compuestos nitrogenados, primero se absorbe amonio, después nitritos y por último nitrato. Sin embargo, hay casos en que nitrato, nitrito y amonio son asimilados simultáneamente (Oscanoa-Huaynate *et al.* 2021). Lin *et al.* (2016) menciona que la preferencia por el NH_4^+ es porque se requieren pocos pasos bioquímicos y un bajo requerimiento energético para su asimilación, esto es reforzado por Kube *et al.* (2018) quienes mencionan que cuando ambas formas de nitrógeno están presentes el consumo de NO_3^- es mínimo hasta que se elimina la mayor parte del NH_4^+ . Medina-Aguilar (2016) nos detalla claramente la ruta metabólica del nitrógeno, la cual se inicia con la incorporación de NO_3^- al interior de la célula, donde la capacidad de sintetizar y asimilar los compuestos nitrogenados depende de forma directa de dos enzimas, la Nitrato reductasa (encargada de la transformación del nitrato en nitrito) y la nitrito reductasa (que reduce el nitrito a amonio). El nitrato es captado del agua y translocado a través de la membrana celular mediante procesos dependientes energéticamente. El exceso de nitrato se almacena en el interior de las vacuolas, mientras, una fracción del mismo es metabolizado en el citoplasma, reduciéndose a nitrito por la acción de la enzima Nitrito Reductasa con el NAD(P)H como elemento donante de electrones. El nitrito formado se traslada al cloroplasto y se reduce a amonio, para su asimilación en compuestos orgánicos, con la ferredoxina como fuente de electrones. Los iones nitrito y los iones amonio sintetizados durante el proceso descrito, no pueden ser acumulados en el interior de las células ya que ambos son citotóxicos, su exceso provoca daños por oxidación y cambios

en el pH del interior celular. Por lo tanto, su incorporación a los compuestos orgánicos nitrogenados debe ser lo más rápida posible siendo, en algunos casos, su concentración, el factor determinante para la inhibición de la enzima. La asimilación del amonio tiene lugar en el interior de los cloroplastos a través de la acción de la glutamina sintetasa y la glutamina 2- oxoglutaratoaminotransferasa (Fig. 1).

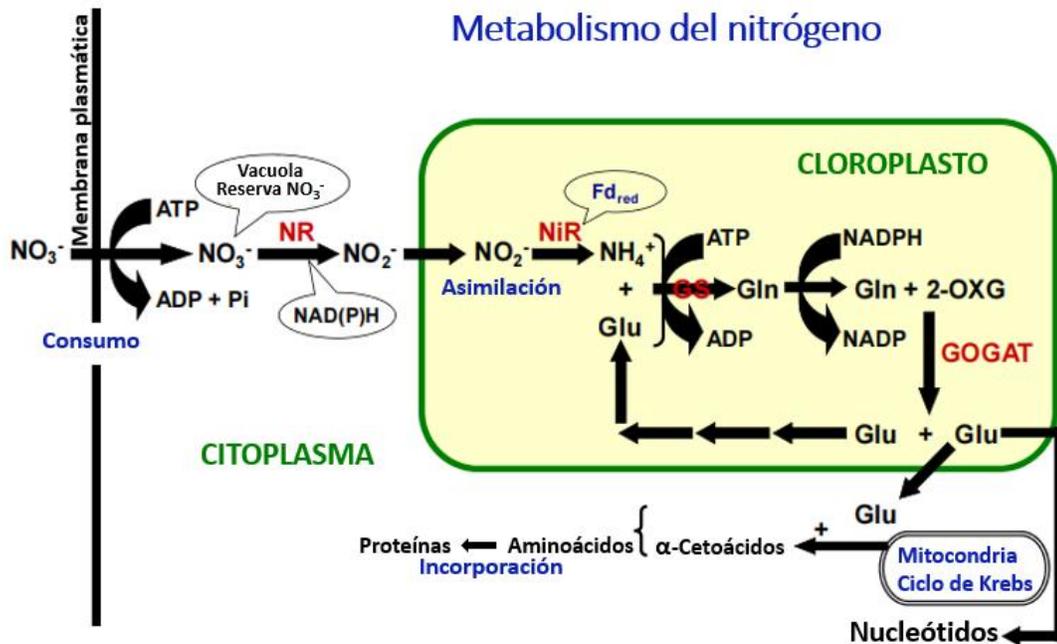


Fig. 1 Metabolismo del nitrógeno (Fuente: Chow *et al.* 2012).

Al cultivar microalgas en los efluentes, es importante conocer los niveles de amonio, ya que las concentraciones altas (NH_4^+) inhiben la actividad de la nitrato reductasa (NR) y por lo tanto, disminuyen la captación de NO_3^- , se ha observado que con algunas clorofíceas se muestra un crecimiento reducido por encima de 106 ppm (mg L^{-1}) (Kube *et al.* 2018), en otros casos, se han observado microalgas en aguas residuales ricas en amonio y se han seleccionado algunas especies, ya que estas presentan una fuerte tolerancia a altas concentraciones ($173 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ - $893 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$), sin embargo, las aguas residuales a menudo se

mantienen o se diluyen en concentraciones bajas de amonio ($<30 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$) antes de alimentar a las microalgas, la limitación del amonio al cultivo de algas se debe probablemente a la inhibición de la fotosíntesis al dañar el fotosistema o al desacoplar la fotofosforilación con el transporte de electrones (Lin *et al.* 2016). Respecto a la demanda química de oxígeno, Iriarte *et al.* (2007) menciona que las algas liberan exudados y materia orgánica particulada, producto de la reducción y conversión de nutrientes inorgánicos a compuestos orgánicos que estructuran el metabolismo celular del fitoplancton y que promueve el crecimiento de los componentes de la trama trófica, desde bacterias a microorganismos mesozooplantonicos (Fig. 2).

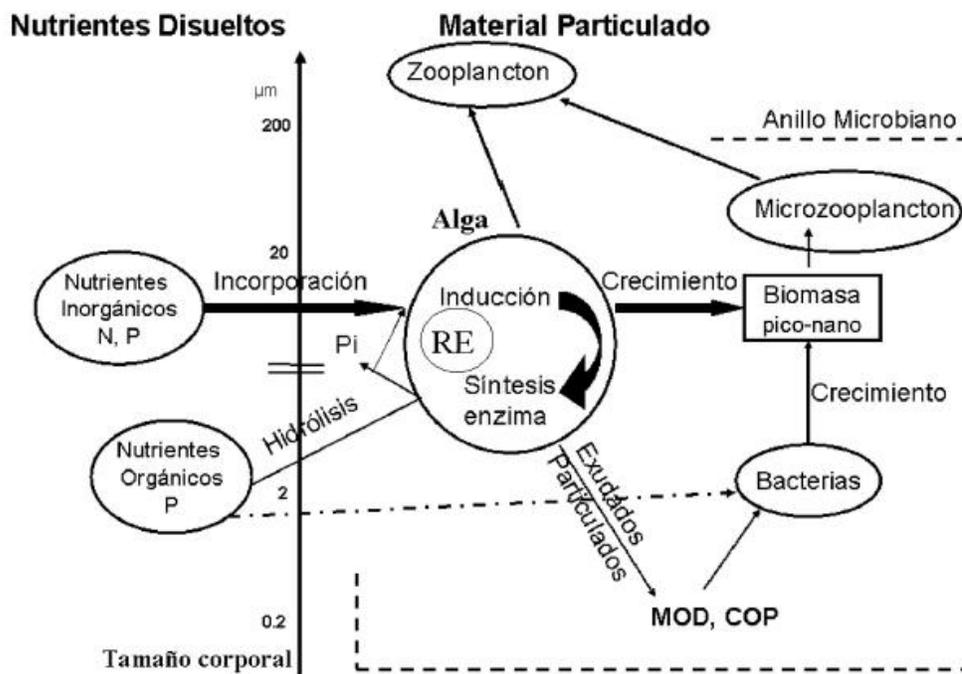


Fig. 2 Representación esquemática de una trama trófica del sistema marino, adicionando procesos de incorporación de nutrientes inorgánicos disueltos y transformación a materia orgánica particulada (MOP) vía reacciones metabólicas enzimáticas (RE) de los productores primarios (Fuente: Iriarte *et al.* 2007).

Cuando en el cultivo, no se tiene limitación de nutrientes la tasa de fotosíntesis puede ser mejorada con una irradiancia óptima. El aumento de la irradiancia causa un incremento en la tasa fotosintética de la microalga hasta alcanzar las tasas de crecimiento máximo. La limitación de la luz provoca una distribución desigual en el cultivo, así también las microalgas están expuestas a diferentes cantidades de luz de acuerdo a los diferentes puntos del sistema. Cuando la luz es baja o la cantidad de nutrientes es moderada, la productividad no puede ser mejorada solo con la fuente de luz, ya que los nutrientes son una necesidad crucial en el crecimiento de las microalgas comparadas con la luz, por lo que se aclara que la forma de nitrógeno preferida es el amonio, específicamente con *C. vulgaris* donde el nitrato se consume cuando el amonio es agotado (Haritz y Takriff, 2017). Existen factores que pueden influir en la captación de fosfatos por parte de las algas como son: ausencia de potasio, magnesio o sodio y un pH alto o bajo (Palacios-Sánchez, 2022).

Las microalgas más cultivadas a nivel mundial son: *Spirulina spp.*, *Chlorella spp.*, *Haematococcus pluvialis* y *Nannochloropsis spp.*, en una escala que va desde la producción en un patio trasero hasta la comercial, en muchos países se destinan para la elaboración de complementos para la nutrición humana y otros usos (FAO, 2020). De las microalgas mencionadas las especies de *Chlorella* y *Nannochloropsis*, han ganado más atención recientemente porque son especies potenciales disponibles en la producción de bioenergías debido a sus composiciones bioquímicas para la producción de bioenergías / biocombustibles (Kanna *et al.* 2021).

2.4.2 *Chlorella vulgaris*

Taxonomía de *Chlorella vulgaris* (Gómez-Castillo y Rodríguez-Manrique, 2012):

Reino: Protocista

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Oocystaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *vulgaris*

Chlorella es una microalga unicelular de forma cocoide con un diámetro medio de 2 a 10 μm sin flagelos. Es una especie de alga microscópica verde. Tiene alta actividad fotosintética. *Chlorella* es una microalga rica en proteínas. Consiste en tres biopolímeros principales como proteínas (51 a 60%), carbohidratos (12 a 30%) y lípidos (4 a 22%). El cloroplasto de la especie *Chlorella* está lleno de pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y la clorofila b. La especie *Chlorella* tiene una pared celular rígida. Tiene 30 especies diferentes, entre ellas *Chlorella vulgaris* se emplea ampliamente para varios tipos de producción de biocombustible. Las paredes celulares de *Chlorella* son típicamente conocidas por su rigidez, estructura compleja y estabilidad (Kanna *et al.* 2021). Yamada y Sakaguchi (1982) documentaron la estructura de la pared celular de *Chlorella* en tres tipos de estructura: tipo I, consta de dos capas, la primera y la más interna con una capa microfibrilar (MF) transparente a los electrones voluminosos, mientras que la segunda capa exterior es la capa trilaminar (ATL); tipo 2, consta de dos MF capas sin ATL como capa exterior y tipo 3, consta de una sola capa MF. También menciona que la estructura/composición de la pared celular podrían ser considerablemente diferentes entre una cepa a otra, determinó que la estructura tipo I, predominan los polisacáridos como la celulosa; tipo II, mayormente celulosa y poca pectina; y tipo III, mucha pectina una pequeña cantidad de polisacáridos enlazados.

Kanna *et al.* (2021) menciona que en la fase de crecimiento inicial de las especies de *Chlorella*, la estructura de la pared celular es de una sola capa, es delgada y se denomina capa hija. Sin embargo, en la célula madura se revela como una estructura de doble o triple capa, que es una capa densa de electrones gruesa y

se conoce como pared madre madura. La Fig. 3 ilustra la representación esquemática de la célula de *Chlorella* y la estructura de la pared celular.

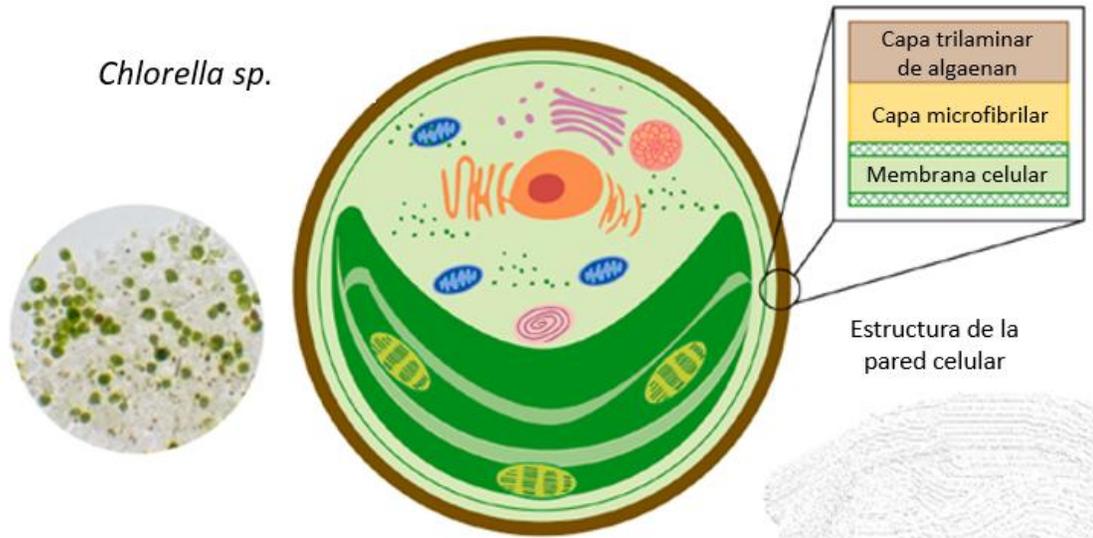


Fig. 3 *Chlorella* sp (Fuente: Kanna et al. 2021).

2.4.3 *Nannochloropsis oculata*

La clasificación taxonómica de *Nannochloropsis* sp (Palacios-Sánchez 2022):

Reino: Chromista

Phylum: Heterokontophyta

Clase: Eustigmatophyceae

Familia: Monopsidaceae

Género: *Nannochloropsis*

Especie: *oculata*

La clase Eustigmatophyceae agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), especialmente ácido eicosapentanoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Ávila-Morales, 2015). *Nannochloropsis* es un género de microalgas verdes,

de forma esférica inmóvil con un diámetro medio de 2 a 3 μm . A menudo se encuentra tanto en ambientes dulces como marinos. Contiene una gran cantidad de clorofila a con ausencia total de clorofila b y clorofila c. Tiene seis especies principales: *Nannochloropsis gaditana*, *N. granulada*, *N. limnetica*, *N. oceanica*, *N. oculata*, *N. salina*. Son capaces de sintetizar biopigmentos de alta calidad como astaxantina, zeaxantina y cantaxantina, que se utilizan para diversas aplicaciones industriales. Además, tienen la capacidad de acumular una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados. Las especies de *Nannochloropsis* tienen una pared celular densa y de múltiples capas como se muestra en la Fig. 4. Consiste en una capa de celulosa y ATL no hidrolizable. La estructura de la pared celular de las especies de *Nannochloropsis* es diferente de otras especies de microalgas. La capa más interna de la pared celular es permeable con una varilla cilíndrica fibrosa en forma de varilla y actúa como material de soporte. Junto a la capa de celulosa, se encuentra una capa delgada de ATL con una extensión similar a un cabello como capa protectora más externa (Kanna *et al.*, 2021).

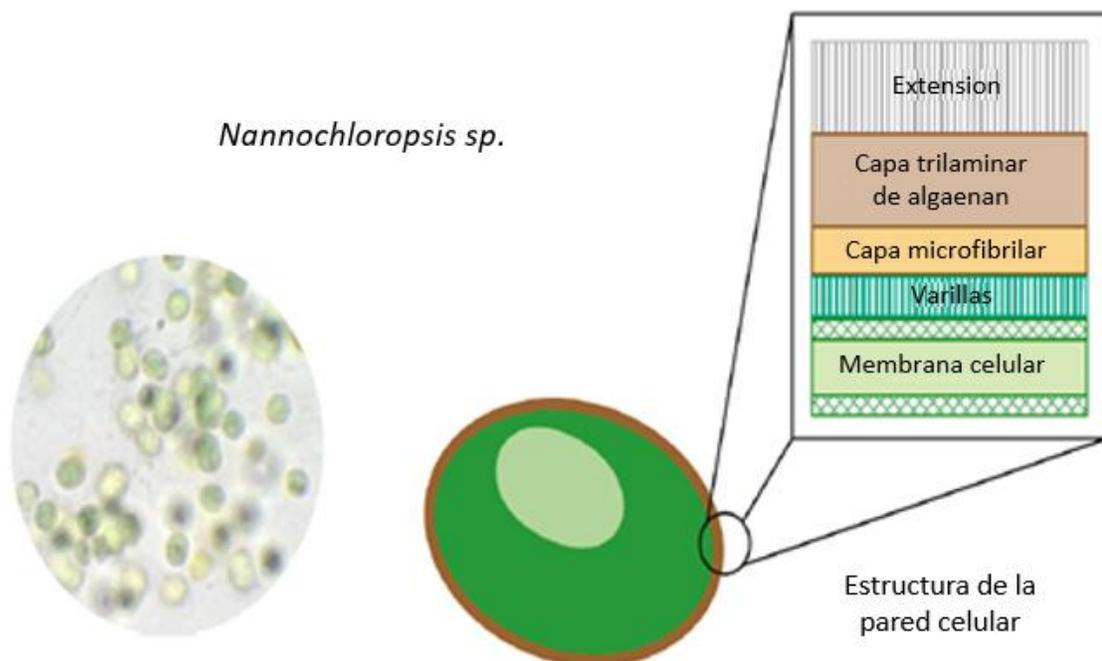


Fig. 4 *Nannochloropsis* sp (Fuente: Kanna *et al.* 2021).

2.5 Biogás

El biogás es una mezcla de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) (Gabriel y Sierra, 2017) y en menor medida otros gases, se destaca el sulfuro de hidrógeno (H_2S), un gas altamente tóxico, responsable del olor fuerte y desagradable que se percibe en los ambientes naturales donde se genera biogás (FAO, 2019). Su composición depende del sustrato que se utilice para alimentar al biodigestor, de la tecnología utilizada y la temperatura de procesos (Gabriel y Sierra, 2017; FAO, 2019).

El biogás se considera uno de los biocombustibles más prometedores y tiene potencial para mitigar, en cierta medida, las crecientes preocupaciones sobre los combustibles fósiles, relacionadas con la crisis energética y el cambio climático (Zabed *et al.* 2020). Al ser purificado a CH_4 puede usarse para generar calor o electricidad, así como también puede inyectarse en redes de distribución de gas o como combustible vehicular (FAO, 2019).

El biogás se puede producir a partir de diversas fuentes de biomasa; microalgas, desechos alimentarios, residuos agrícolas, abonos animales, desechos avícolas, desechos sólidos municipales, desechos industriales, desechos forestales, algunos cultivos energéticos dedicados (Zabed *et al.* 2020) y residuos agroindustriales (Gabriel y Sierra, 2017). Aunque cada biomasa tiene su propio potencial y factibilidad para generar biogás, las microalgas han mostrado mucho interés en este propósito desde la década de 1950, particularmente por la rápida tasa de crecimiento, la utilización del CO_2 atmosférico y la idoneidad para cultivar en tierras no cultivables utilizando aguas residuales como medio de crecimiento (Zabed *et al.* 2020).

2.5.1 Producción de biogás

La digestión anaeróbica es el medio más eficiente para generar energía a partir de residuos con contenido de materia seca inferior al 30% (rango ideal 5-12%) como: estiércoles, lodos de aguas residuales, alimentos y otros desechos orgánicos húmedos (Gabriel y Sierra, 2017). Zabed *et al.* (2020) mencionan que el biogás producido por la digestión anaeróbica está compuesto primariamente por CH₄ (55-70%) y CO₂ (30-45%) y pequeñas cantidades de H₂S (50-2000), H₂O, O₂ e hidrocarburos en cantidades traza, mientras que el sobrante es un residuo orgánico rico en nitrógeno. Las etapas de la digestión anaeróbica constan de diferentes reacciones que se desarrollan en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Tabla 1), siendo en esta última donde se produce metano por diferentes rutas y reacciones (Tabla 2).

Hidrólisis. La materia orgánica compleja (hidratos de carbono, proteínas, lípidos, etc.) es degradada por la acción de microorganismos en materia orgánica soluble (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos), lo que genera los sustratos para la siguiente etapa (FAO, 2019; Abbasi *et al.* 2012).

Acidogénesis. Los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos se fermentan para formar ácidos grasos volátiles, principalmente ácido láctico, propiónico, butírico y valérico (Abbasi *et al.* 2012).

Acetogénesis. Las bacterias consumen estos productos de fermentación y generan ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Abbasi *et al.* 2012).

Metanogénesis. Los organismos metanogénicos consumen acetato, hidrógeno y parte del dióxido de carbono para producir metano. Los metanógenos utilizan tres vías bioquímicas: (a) vía acetotrófica, b) vía hidrogenotrófica y c) vía metilotrófica (Abbasi *et al.* 2012).

Tabla 1. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia (Abbasi *et al.* 2012).

Etapa	Microorganismos (Bacterias)
Hidrólisis $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O = n(C_6H_{12}O_6)$	
Acidogénesis $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O = 2CH_3COOH + 4H_2 + CO_2$	<i>Bacteriodes, clostridium</i>
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 = 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	<i>Butyrivibrie, eubacteriu</i>
$C_6H_{12}O_6 = CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	<i>Bifidobacterium, lactobacillus</i>
$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH$	
$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	
Acetogénesis $CH_3CHOHCOOH + H_2O = CH_3COOH + CO_2 + 2H_2$	<i>Desulfovibrio, syntrophobacter</i>
$CH_3CH_2OH + H_2O = CH_3COOH + 2H_2$	<i>Wolinii, syntrophomonas</i>
$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O = 2CH_3COOH + 2H_2$	
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O = CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$	
Metanogénesis $4H_2 + CO_2 = CH_4 + 2H_2O$	<i>Methanobacterium formicicum</i>
$2CH_3CH_2OH + CO_2 = 2CH_3COOH + CH_4$	<i>Methanobacterium bryantii,</i>
$2CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2O + CO_2 = 4CH_3COOH + CH_4$	<i>Methanobrevibacter</i>
	<i>Ruminantium,</i>
$CH_3COOH = CH_4 + CO_2$	<i>Methanobrevibacter</i>
	<i>Arboriphilus</i>
	<i>Methanospirillum hungatei</i>
	<i>Methanosarcina barkeri</i>

Tabla 2. Rutas y reacciones para producir metano (Abbasi *et al.* 2012).

Ruta	Reacción
Acetotrófica	$4CH_3COOH \rightarrow 4CO_2 + 4CH_4$
Hidrogenotrófica	$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
Metilotrófica	$4CH_3OH + 6H_2 \rightarrow 3CH_4 + 2H_2O$

2.5.2 Inóculos bacterianos

La fuente de microorganismos (inóculo) para realizar la digestión anaerobia proviene de diferentes excretas como vacas, cerdos, cabras o de lodos de plantas de tratamiento de agua residual. Durazno-Coronel (2018) realizó un estudio de valoración energética donde calculó la cantidad de biogás producido a partir de excretas de vacas, cerdos, ovejas, cabras, aves de corral, conejos y caballos. Los resultados indicaron que los desechos orgánicos de animales que representan un mayor potencial en la producción de biogás son: los porcinos (34.4 %), ovejas/cabras (33.4 %), aves de corral (16.8 %) y bovinos (15 %), mientras que las cantidades de biogás de conejos y caballos son insignificantes. Así mismo, estos microorganismos necesitan condiciones de pH específicas, para microorganismos metanógenos de 7.8-8.2 y acetógenos de 5.5-6.5, y al tener que coexistir ambos microorganismos se debe utilizar un pH cercano a la neutralidad de 6.8-7.4 (Torrecilla del rey, 2021).

2.5.3 Pretratamiento del sustrato (biomasa de microalgas)

Los pretratamientos (Fig. 5) buscan romper la pared celular, reducir el tamaño de las partículas de biomasa y aumentar el área de superficie específica, reducir la cristalinidad de algunos materiales fibrosos, solubilizar materiales recalcitrantes y biodegradables difíciles, hidrolizar parcialmente polímeros celulares y desactivar materiales tóxicos, así como preservar el contenido de materia orgánica de biomasa y evitar la formación de posibles sustancias o materiales inhibidores y tóxicos que afecten la digestión anaeróbica. Algunas de las estrategias de pretratamiento aplicadas a los cultivos de microalgas se basan en experiencias de plantas de tratamiento de lodos de agua ya que estas tienen la posibilidad de encontrar una gran cantidad de celulosa proveniente de las paredes celulares de organismos fotosintéticos. Los pretratamientos se clasifican en físicos y digestivos (Córdova *et al.* 2017).

Los pretratamientos físicos se evalúan por su capacidad para aumentar la producción de biogás. Se subdividen en térmicos, hidrotermales y mecánicos. Los pretratamientos térmicos e hidrotermales funcionan mediante aumento de temperatura y presión, respectivamente, y buscan solubilizar microalgas. En los pretratamientos mecánicos, como ultrasonidos, microondas y homogeneizadores, el objetivo es solubilizar material orgánico de microalgas mediante fuerza física, que rompe las células (Córdova *et al.* 2017).

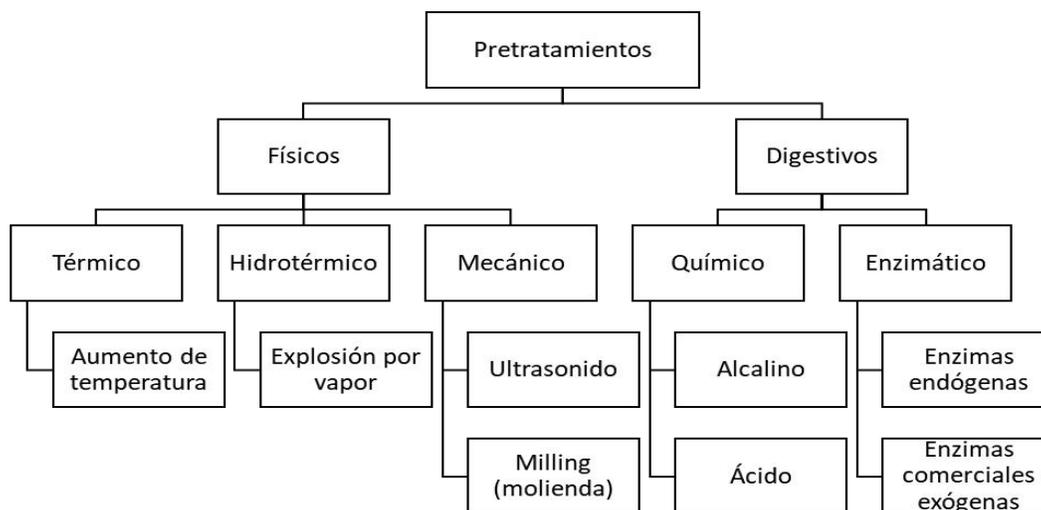


Fig. 5 Clasificación propuesta para el pretratamiento de microalgas para digestión anaeróbica en la producción de biogás (Córdova *et al.* 2017).

El pretratamiento ultrasónico rompe la célula microbiana por cavitación, liberando el material intracelular. El pretratamiento térmico también puede combinarse utilizando calentamiento, presurización y descompresión (explosión de vapor). Este pretratamiento combinado destruye las paredes celulares y libera el contenido celular intracelular, que se vuelve accesible para la degradación. Una de las desventajas del pretratamiento térmico es que pueden formarse compuestos recalcitrantes que podrían inhibir la digestión anaerobia. Los pretratamientos aumentan la solubilización del COD (demanda química de oxígeno), pero también aumentan las concentraciones de N-NH_4^+ y NT (nitrógeno total). Alzate *et al.* (2012)

mencionan que la mayor solubilización de COD no necesariamente aumenta la producción de biogás, por lo que, en caso del ultrasonido es suficiente utilizar $10000 \text{ kJ kg ST}^{-1}$, con el pretratamiento térmico encontraron un mayor grado de solubilización a 170°C por 1 h, pero el mayor rendimiento de biogás lo obtuvo a 110°C por 1 h.

Los pretratamientos digestivos se subdividen en químicos y enzimáticos. Los pretratamientos químicos son ácidos, alcalinos y oxidativos. Estos pretratamientos se asocian a una serie de inconvenientes como son: el aumento de la incidencia de procesos inhibidores por producción de sustancias tóxicas y la posible liberación de compuestos contaminantes o tóxicos al medio, como el furfural, hidroximetilfurfural o sodio, entre otros. En este proceso se pierde material biodegradable, debido a inhibidores, lo que puede afectar negativamente el proceso, por lo que se considera una opción insostenible, además de que aumenta los costos. Los pretratamientos enzimáticos se basan en la utilización de extractos enzimáticos de diferentes orígenes con el objetivo de permear las paredes celulares de las microalgas de tal forma que la liberación de compuestos al medio sea más específica. Al utilizar enzimas en los pretratamientos se debe evaluar el balance energético, es decir, si la energía utilizada para aplicar el pretratamiento se compensa con aumentos en el biogás obtenido, ya que el costo de las enzimas es una de las principales barreras para la producción de biocombustibles (Córdova *et al.* 2017).

2.6 Utilización de las microalgas en el tratamiento de aguas

Las microalgas se están utilizando en el tratamiento de aguas residuales y diferentes tipos de efluentes para eliminar nutrientes y metales pesados del agua. Martínez-Macias *et al.* (2019) y Aguilar-Ruiz *et al.* (2020) realizaron experimentos con *Nannochloropsis oculata* utilizando efluentes ácidos del drenaje de las minas para determinar la remoción de cobre, principal metal presente en estos efluentes.

En el estudio realizado por Martínez-Macias *et al.* (2019) se observó que *N. oculata* fue capaz de eliminar hasta el $99.92 \pm 0.04\%$ de cobre a diferentes concentraciones probadas, ellos determinaron que este proceso se realizó a través del metabolismo y por adsorción. Se observó un aumento de la producción de lípidos a partir de una concentración de cobre de 0.1 mmol L^{-1} en el medio, por lo que concluyeron el potencial beneficio hacia la producción de biodiesel. Aguilar-Ruiz *et al.* (2020) obtuvieron una eliminación de $94.88 \pm 0.43\%$ a una concentración de cobre superior a $1.74 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$, encontraron un efecto positivo en el contenido de lípidos a una concentración de cobre mayor a $4.64 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$, produciendo $77.04 \pm 2.60\%$ de contenido de lípidos, dos veces más alto que el alcanzado en el cultivo control de $33.058 \pm 5.398\%$, potenciando así la producción de biodiesel. Parsi *et al.* (2020) realizaron un estudio con *Nannochloropsis oculata* para determinar su capacidad de crecer en un medio realizado con una mezcla de agua de mar y agua producida con solución salina obtenida durante la extracción de petróleo y gas, complementada con digestato líquido del proceso de digestión anaeróbica como fuente de nutrientes, donde obtuvieron que esta combinación es buena como medio para el cultivo de microalgas y que si se cuidan la salinidad (menor a 60 g L^{-1}) y las proporciones N/P se puede obtener un buen crecimiento y una eliminación de amonio hasta del 100%, sumando a esto la eliminación de hierro. Singh *et al.* (2022) realizaron un ensayo con microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus*) para eliminar nutrientes y metales pesados en aguas residuales municipales a diferentes concentraciones (25-100%), con luz blanca fluorescente ($20 \text{ W/m}^2 = 43 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a 20°C con fotoperíodo 16:8 (luz: oscuridad) por 16 días. Los resultados revelaron que la eliminación de nutrientes (93.28 %) y metales pesados (92.08 %) fue máxima al 25 % de la concentración de aguas residuales con ambas microalgas.

2.6 Cinética de crecimiento de *C. vulgaris* y *N. oculata*

El tiempo en el que se alcanzan las diferentes fases de crecimiento varían de acuerdo con la irradiancia, el fotoperíodo, la densidad celular, etc., como lo reportan diversos autores. Ferrer-Álvarez *et al.* (2015) utilizando microalgas (*C. vulgaris* y *N. oculata*) y efluente de tilapia como medio de cultivo con Medio Basal Bold como control, una irradiancia de $79.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas Multi-LEDs y luz blanca, a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 días encontró la fase de crecimiento exponencial en los días 3-5 y la fase estacionaria en los días 6-7 con ambas microalgas. La densidad celular alcanzada en la fase exponencial varió de 4.75×10^7 a $5.63 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ con iluminación Multi-LEDs y de 3.43×10^7 a $4.52 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ con Luz blanca. Con *N. oculata* obtuvo una productividad de biomasa de 0.0141 a $0.0357 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en fase exponencial y de 0.0313 a $0.0571 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en fase estacionaria con el control, con efluente de tilapia en fase exponencial de 0.0205 a $0.0219 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, en fase estacionaria de 0.0279 a $0.0320 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Con *C. vulgaris* en Medio Basal Bold obtuvo 0.0357 a $0.0459 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en fase exponencial, de 0.0854 a $0.0543 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en fase estacionaria, con efluente de tilapia en fase exponencial obtuvo 0.0316 a $0.0446 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y en fase estacionaria de 0.0456 - 0 a $0.0401 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Sin embargo, El-Sheekh *et al.* (2016) cultivando *Nannochloropsis oculata* en medio F/2, con una irradiancia de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 26°C , iniciando con una densidad celular de $1.5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ encontraron la fase de crecimiento exponencial entre el día 4 y 10 con una densidad celular de $4.5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$, la fase estacionaria del día 10 al 12 con $5.0 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$. Paes *et al.* (2016) realizaron cinéticas de crecimiento con *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata*, utilizando medio Conway a 21°C , salinidad de 33, $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, encontrando para *Chlorella sp.*, la fase exponencial entre el día 4-7 y estacionaria entre el 9-12. Para *N. oculata* la fase exponencial entre el día 4-7 y estacionaria entre el 10 y 12. Cabe destacar que se observa un crecimiento exponencial desde el día 1, sin observar una fase de adaptación con ambas microalgas. Álvarez-Meza (2017) realizando cinéticas de crecimiento con *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis*

oculata con diferentes volúmenes (0.5, 1, 7 y 160 L), en medio F/2 de Guillard, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente) con luz artificial encontró que la fase de crecimiento exponencial se encuentra entre los días 1-3, la fase estacionaria en los días 3-4 y la fase de muerte 4-5. Alcanzando densidades de 3.45×10^6 cel mL⁻¹ (fase exponencial), 3.52×10^6 cel mL⁻¹ (fase estacionaria) con *C. vulgaris*, y 9.20×10^7 cel mL⁻¹ (fase exponencial), 9.13×10^7 cel mL⁻¹ (fase estacionaria) con *N. oculata*. Kumaran *et al.* (2023) realizaron un ensayo utilizando *Chlorella vulgaris* y efluentes de molinos de aceite de palma utilizando diferentes proporciones de dilución (1:1, 1:2, 1:3 y 1:4), con $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 24 horas luz con lámparas fluorescentes blancas a 25°C . Con la dilución 1:4 obtuvieron los mejores resultados de crecimiento encontrando la fase exponencial en los días 4-7 y estacionaria entre los 9 y 11 días, la cosecha la realizaron en el día 7, la máxima producción obtenida fue de 0.42 g L^{-1} (productividad de $0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y 21% de lípidos en peso seco. En el control BG-11 la fase exponencial en los días 5-8 y estacionaria en los días 10-11, una producción de 0.34 g L^{-1} (productividad de $0.048 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y 18.5% de lípidos.

2.8 Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatados y materia orgánica.

La remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y materia orgánica en diferentes tipos de efluentes ha sido reportada por diversos autores, así como el comportamiento dinámico en medio establecido Conway (Paes *et al.* 2016). Paes *et al.* (2016) realizaron ensayos de remoción de compuestos nitrogenados y fosfatados en medio Conway y limitación de nitrógeno después del día 7, para ello utilizaron dos microalgas (*Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata*), a 21°C . En el comportamiento dinámico observaron que el agotamiento de nitrato ocurrió en el día 10 u 11 del cultivo en todos los experimentos, en caso del nitrito se observó un aumento entre el día 1 y 6, después la concentración bajó hasta los niveles iniciales al final del experimento con ambas microalgas. En caso del amonio se observó un aumento en el día 4 con ambas microalgas, un descenso continuo

para los controles y un segundo aumento para los tratamientos con limitación de nitrógeno a partir del día 7, y una disminución al final del experimento, por lo tanto, las concentraciones variaron (0.0-3.7 μM) a lo largo del ensayo. En caso del fosfato, se inició con aproximadamente 125 μM , la captación de fosfato fue casi total en el control para *N. oculata*, alcanzando 1.3 μM al día 13 de cultivo. Para *Chlorella sp.*, en el control la concentración promedio de fosfato fue de 9.4 μM al día 13 de cultivo, lo que equivale a ~92.7% de consumo de la concentración inicial de fosfato agregado al medio de cultivo. En los experimentos N- el enriquecimiento con fosfato ocurrió cuando los cultivos aún tenían unos 27-34 μM del fosfato original disuelto, generando picos de fosfato (~155 μM) en el 7° día de crecimiento, como resultado de la adición del nutriente Conway soluciones sin NaNO_3 . Una alta concentración de fosfato todavía estaba presente en el medio de cultivo al final de los experimentos N-: 73 μM para *Chlorella sp.*, y 81 μM para *N. oculata*. Con efluentes de peces, se tiene el estudio de Ferrer-Álvarez *et al.* (2015), quienes realizaron ensayos para determinar la remoción de compuestos nitrogenados y fosfatados en efluente de tilapia utilizando dos microalgas (*C. vulgaris* y *N. oculata*), una irradiancia de 79.88 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas Multi-LEDs y luz blanca, una temperatura de 20 ± 2 °C durante 10 días. En el comportamiento dinámico de los compuestos nitrogenados y fosfatados utilizando *N. oculata*, observaron lo siguiente: con ambos tipos de luz el amonio, nitrito y nitrato aumentaron, pero fue más evidente el aumento del nitrato de 58 mg L^{-1} a 80-100 mg L^{-1} , en caso del fosfato no hubo remoción con Multi-LEDs, con luz blanca se observó una remoción del 50%. Utilizando *C. vulgaris*, no obtuvieron remoción del amonio, con el nitrito observaron una remoción gradual hasta el 100% con luz blanca, con el nitrato observaron remoción con luz blanca con una disminución de 140 mg L^{-1} a 20 mg L^{-1} , con Multi-LEDs la remoción fue negativa. En el caso del fosfato, la remoción fue positiva. Las eficiencias de remoción reportadas en esta investigación son: con *C. vulgaris* e iluminación Multi-LEDs con 1.32, 30, 41.73 y 66.33% para el amonio, nitrito, nitratos y fosfatos, respectivamente; con luz blanca de 22.60, 83, 51.95 y 45% para el amonio, nitrito, nitratos y fosfatos, respectivamente. Con *N. oculata* e

iluminación Multi-LEDs con 12.50, 0, 0 y 24.96 % para el amonio, nitrito, nitratos y fosfatos, con luz blanca 12.50, 0, 3.65 y 47.48 % de amonio, nitrito, nitratos y fosfatos. Calderini *et al.* (2021) realizaron un ensayo para eliminar compuestos nitrogenados y fosfatados de un efluente de pez *Laukaa* cultivados en un sistema de recirculación utilizando tres especies de microalgas (*Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium griffithii* y *Selenastrum sp*), como resultado obtuvieron una remoción de PO₄-P del 99% por *M. griffithii* y *Selenastrum sp*, menos del 75% por *H. Pluvialis*. En la remoción de NO₃-N: menos del 40% en las 3 especies. En cuanto a densidad celular, eliminación de nutrientes, ácidos grasos y aminoácidos no hubo diferencia, aunque *H.Pluvialis* disminuyó la cantidad de omega-3 y 6 en agua sin filtrar. Con efluentes de aguas residuales municipales, Haritz y Takriff (2017) mencionan que *C. vulgaris* es capaz de eliminar hasta un 99.7, 89.5, 92 y 75.5% de amonio, nitrógeno total, fósforo total y demanda química de oxígeno, respectivamente, en 5 días. Gil-Izquierdo *et al.* (2020) evaluaron la capacidad de microalgas autóctonas en la eliminación de contaminantes ambientales (nitratos y fosfatos) y emergentes (simazina, atrazina, terbutilazina, adenosina e ibuprofeno) presentes en las aguas residuales del cauce seco del río El Albuñón, para ello utilizaron fotobiorreactores con microalga, como forma de minimizar el proceso de eutrofización del Mar Menor, utilizando luz y temperatura ambiental. En particular, evaluaron la capacidad de cuatro consorcios de microalgas recolectadas en diferentes lugares de la laguna salada, de los cuatro consorcios de microalgas, el consorcio 1 (*Monoraphidium sp.*, *Desmodesmus subspicatus*, *Nannochloris sp.*) fue el mejor en términos de productividad de biomasa (0.11 g L⁻¹ d⁻¹) y tasa de crecimiento específica (0.14 d⁻¹), proporcionando un 100 % de eliminación de contaminantes emergentes, y una máxima reducción en el consumo de macronutrientes, especialmente nitratos y fosfatos, alcanzando niveles por debajo de 28 mg L⁻¹, es decir, una disminución de 89.90% (nitratos) y 99.70% (fosfatos). Con efluentes del sector ganadero y avícola, López-Sánchez *et al.* (2022a) realizaron una recopilación de estudios sobre la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y demanda química de oxígeno (DQO) donde encontraron:

con *Chlorella vulgaris* una producción de biomasa de 0.49-3.96 g L⁻¹, remociones de 25-99% de DQO, 50-98% de nitrógeno total y de 41-95% de fósforo total en aguas residuales porcinas; 1.1756-1.869 g L⁻¹ de producción de biomasa, remociones de 45-82% de DQO y 89% de fósforo total en aguas residuales de aves de corral; 1.183 g L⁻¹ de producción de biomasa, 62-92% de DQO, 81-94% de nitrógeno total y 85-94% de fósforo total en aguas residuales del ganado. Con *Nannochloropsis oculata* se tienen reportes de 2.36-3.22 g L⁻¹ de producción de biomasa, 64-86% de nitrógeno total y 99% de fósforo total en aguas residuales de digestatos de cerdo. Asimismo, López-Sánchez *et al.* (2022b) realizaron ensayos para eliminar nutrientes (fosfóro y nitrógeno) y materia orgánica utilizando microalgas en efluentes digeridos anaeróbicamente (digestatos) del sector ganadero (porcino, bovino y avícola), probaron tres microalgas *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* y *Chlamydomonas reinhardtii*. El mejor resultado fue con *C. vulgaris* como monocultivo en una mezcla de digestato de 0.125:0.4375:0.4375 (ADSW:ADPW:ADCW), lo que resultó en un crecimiento celular de $3.61 \times 10^7 \pm 2.81 \times 10^6$ cel mL⁻¹, remociones de $85.00 \pm 1.58\%$ de nitrógeno total, $65.69 \pm 3.05\%$ de fosforo total y $43.95 \pm 7.92\%$ de DQO.

2.9 Análisis bioquímico

El análisis bioquímico de *C. vulgaris* y *N. oculata* cultivadas en medios establecidos y efluentes es reportada por los siguientes autores: Paes *et al.* (2016) realizaron el análisis bioquímico de microalgas marinas *Chlorella sp* y *N. oculata* en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, cultivadas en medio Conway y limitación de nitrógeno a partir del día 7, a 21° C, con una irradiancia de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo 12:12. Obteniendo para *C. vulgaris* 34.6% de proteína, 23.3% de carbohidratos, 13.6% de lípidos en fase exponencial, 27.7% de proteína, 40.5% de carbohidratos, 14.9% de lípidos en fase estacionaria; utilizando limitación de nitrógeno obtuvieron 35.8% de proteínas, 22.6% de carbohidratos, 13.9% de lípidos en fase exponencial, 16.6% de proteínas, 54.5% de carbohidratos y 15.3%

de lípidos en fase estacionaria. Para *N. oculata* obtuvieron 30.8% de proteína, 23.3% de carbohidratos, 18.5% de lípidos en fase exponencial, 26.1% de proteína, 29.3% de carbohidratos y 26.3% de lípidos en fase estacionaria, con limitación de nitrógeno obtuvo 29.1% de proteína, 24.1 de carbohidratos y 17.8% de lípidos en fase exponencial, 17.9% de proteína, 29% de carbohidratos y 33.7 % de lípidos en fase estacionaria. Schulze *et al.* (2016) realizaron el análisis bioquímico de *Nannochloropsis oculata*, con diferentes tipos de luces LED a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medio de cultivo F/2 modificado, salinidad de 38 ‰, con suministro del 5% de CO_2 . El análisis bioquímico se realizó en fase estacionaria temprana, obtuvieron un contenido 38-50% de lípidos, 30-57% de proteínas y 7-27% de carbohidratos. Con efluentes de tilapia, Garatachia-Vargas (2018) realizó el análisis de carbohidratos en *C. vulgaris* y *N. oculata*, con una irradiancia de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz continua a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, encontrando un contenido de carbohidratos de 47 y 53% en fase exponencial para *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente. En fase estacionaria de 40 y 50% *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente. Con aguas residuales municipales, Gil-Izquierdo *et al.* (2020) reportan el análisis bioquímico de un consorcio integrado por *Monoraphidium sp.*, *Desmodesmus subspicatus*, *Nannochloris sp.*, que fue el mejor para eliminar contaminantes emergentes, nitratos y fosfatos de las aguas residuales del cauce seco del río El Albujón. Encontrando 30.51% de carbohidratos, 28.09% de lípidos y 13.59% de proteínas. Por último, Kanna *et al.* (2021) realizaron un estudio de revisión de diferentes especies de microalgas y reporta para *C. vulgaris* un contenido de 51.60% de proteínas, 12.30% de carbohidratos y 4.22% de lípidos, destacando que no menciona fase ni medio de cultivo.

2.10 Biogás producido en diferentes ensayos e inóculos bacterianos utilizados

En la producción de biogás, se han realizado diferentes estudios para determinar la factibilidad del uso de microalgas, el rendimiento y el costo-beneficio para ser aplicados en diferentes disciplinas, así como los pretratamientos utilizados. Alzate *et al.* (2012) evaluaron el rendimiento de biometano utilizando lodos activados (inóculo) de un digester anaerobio a 35°C y como sustrato tres mezclas diferentes de microalgas, microalga A (Mezcla 40% *Chlamydomonas*, 20% *Scenedesmus*, 40% *Nannochloropsis*), microalga B (58% *Acutodesmus obliquus*, 36% *Oocystis sp.*, 1% *Phormidium* and 5% *Nitzschia sp.*) y microalga C (*Microspora*). La relación S/I fue de 1. Se probaron tres pretratamientos: hidrólisis térmica (110, 140 y 170° C), ultrasonido (10000, 27000, 40000 y 57000 kJ kg ST⁻¹) y pretratamiento biológico (microaeróbicamente con aire atmosférico en oscuridad por 12 horas a 55° C). Con el pretratamiento ultrasónico a 10000-kJ kg ST⁻¹ se obtuvieron los siguientes rendimientos de metano 310 ± 6 mLCH₄ g VS⁻¹, 209 ± 7 mLCH₄ g VS⁻¹ y 314 ± 8 mLCH₄ g VS⁻¹ para las microalgas A, B y C, respectivamente, lo cual representa en promedio un aumento del 13%, 5% and 23% comparado con el control que fue biomasa no pretratada. Con hidrólisis térmica, las productividades máximas de metano para las microalgas A y B fueron 398 ± 8 mLCH₄ g VS⁻¹ y 307 ± 4 mLCH₄ g VS⁻¹ respectivamente, a 170° C. Con la microalga C, la máxima productividad de metano fue de 413 ± 5 mLCH₄ g VS⁻¹ a 110 C y la mínima fue de 359 ± 3 mLCH₄ g VS⁻¹ a 170 C, cabe mencionar que con esta especie a mayor temperatura se alcanzó una mayor solubilización pero el rendimiento de metano disminuyó. Con el pretratamiento biológico, se obtuvo un promedio de 257 ± 4 mLCH₄ g VS⁻¹, 182 ± 6 mLCH₄ g VS⁻¹, 266 ± 3 mLCH₄ g VS⁻¹, para las microalgas A, B y C, respectivamente. Con el control (biomasa no pretratada) se obtuvo lo siguiente 272 ± 1 mLCH₄ g VS⁻¹, 198 ± 9 mLCH₄ g VS⁻¹ y 255 ± 2 mLCH₄ g VS⁻¹ para las microalgas A, B y C, respectivamente. Este estudio es de vital importancia y es un referente cuando se requiere aplicar un pretratamiento. Posteriormente,

Alzate *et al.* (2013) realizaron ensayos para observar el rendimiento de biometano utilizando lodos activados de un digester anaerobio piloto a 35°C y como sustrato biomasa de *Nannochloropsis gaditana* sin extracción de lípidos (A) y con extracción de lípidos (B). Las condiciones que se utilizaron fueron mesofílica (35° C), buffer: 5 g de NaHCO₃ L⁻¹, la biomasa utilizada fue cultivada en alto contenido de sal. Se utilizó pretratamiento ultrasónico, biológico y térmico. Los resultados obtenidos fueron con biomasa A: 300 ± 1 mL CH₄ g VS⁻¹ (control, biomasa no pretratada), 281 ± 10 mL CH₄ g VS⁻¹ (U1), 274 ± 15 mL CH₄ g VS⁻¹ (U2), 342 ± 15 mL CH₄ g VS⁻¹ (U3), 361 ± 4 mL CH₄ g VS⁻¹ (U4), 243 ± 1 mL CH₄ g VS⁻¹ (B1), 248 ± 4 mL CH₄ g VS⁻¹ (B2), 399 ± 10 mL CH₄ g VS⁻¹ (T1), 417 ± 2 mL CH₄ g VS⁻¹ (T2) y (403 ± 12 mL CH₄ g VS⁻¹ (T3); y con biomasa B: 331 ± 1 mL CH₄ g VS⁻¹ (control), 318 ± 0 mL CH₄ g VS⁻¹ (U1), 348 ± 7 mL CH₄ g VS⁻¹ (U2), 356 ± 6 mL CH₄ g VS⁻¹ (U3), 382 ± 10 mL CH₄ g VS⁻¹ (U4), 321 ± 12 mL CH₄ g VS⁻¹ (B1), 289 ± 4 mL CH₄ g VS⁻¹ (B2), 381 ± 9 mL CH₄ g VS⁻¹ (T1), 362 ± 0 mL CH₄ g VS⁻¹ (T2) y 345 ± 8 mL CH₄ g VS⁻¹ (T3). Se observó con la biomasa A, un aumento mayor del 30% con respecto al control con el tratamiento térmico, lo que no se pudo lograr con la microalga B, así mismo, se obtuvo una disminución de la producción con el pretratamiento ultrasónico U1 y U2 con la microalga A y U1 con la microalga B, un aumento del 14 al 20% con U3 y U4 con respecto al control con la microalga A, y del 15 % con U4 (microalga B). Nota: Ultrasonido: U1= 10000 kJ kg ST⁻¹, U2 = 27000 kJ kg ST⁻¹, U3= 40000 kJ kg ST⁻¹, U4 = 57000 kJ kg ST⁻¹; pretratamiento térmico: T1 = 110 ± 5 °C (1.4 ± 0.2 bar), T2 = 140 ± 4°C (4±0.2 bar), T3 = 170 ± 3°C (6.4 ± 1 bar); pretratamiento biológico incubados en oscuridad con agitación a 55°C por 12 horas (B1) y 24 horas (B2). Lo observado anteriormente es un referente para aplicar un pretratamiento a biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis*. Por otro lado, Gonzalez-Calzada (2016) realizó un ensayo de producción de biogas utilizando lodos digeridos no adaptado de una EDAR y como sustrato microalgas (*Scenedesmus*, *Diatomea*, *Chlorella* y *Monoraphidium*) provenientes de lagunas de alta carga del tratamiento secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y un consorcio de cianobacterias-

microalgas, donde la especie dominante fue *Oscillatoria*, en menor medida: *Chlorella* y *Monoraphidium*, estas fueron cultivadas en un fotobiorreactor de 30 L, en un tiempo de 8 días. Los pretratamientos utilizados fueron: térmico (75°C por 24 h), termoquímicos con cal (CaO) a 75°C por 24 h con 4 y 10% en peso de sólidos totales (ST) y sosa (NaOH) a 75°C por 24 h con 4 y 10% en peso de ST. El mejor resultado se obtuvo con sosa al 10% con un rendimiento de metano de 258 ± 3 mL g ST⁻¹ y 161 ± 80 mL g ST⁻¹ con microalgas y cianobacterias, respectivamente. Con el control se obtuvo 148 ± 16 mL g ST⁻¹ (microalgas) y 140 ± 4 mL g ST⁻¹ (cianobacterias). Se desestimó la adaptación, la relación utilizada fue de 0.5 g SV_{sustrato}:1 g SV_{inóculo}, se utilizó bicarbonato sódico como buffer. Al final encontró que, el tratamiento térmico aplicado no produjo una buena solubilización de las microalgas, ante su efecto insignificante sobre la mejora de la solubilización o la producción de metano de las microalgas y cianobacterias no existe una justificación para aplicar este pretratamiento. Al mismo tiempo, Caporgno *et al.* (2016) realizaron ensayos para observar el rendimiento de biometano utilizando un lodo digerido mesófilo de una EDAR municipal y como sustrato dos microalgas (*C. vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*), las proporciones sustrato/inóculo fueron de 1:4, 1:2 y 1:1, de acuerdo con este orden los resultados fueron: con *N. oculata* 278, 275 y 282 mL CH₄ g ST⁻¹; con *C. vulgaris*, 229, 223 y 222 mL CH₄ g ST⁻¹. Con lo obtenido anteriormente se utilizaron la proporción sustrato/inóculo 1:2 para realizar ensayos con biomasa a la cual se extrajeron lípidos con hexano y metanol: hexano. Los resultados fueron: con *C. vulgaris* 219 ± 9 mL CH₄ g ST⁻¹ (Sin pretratamiento), 202 ± 1 mL CH₄ g ST⁻¹ (hexano) y 200 ± 4 mL CH₄ g ST⁻¹ (metanol:hexano); con *N. oculata* 253 ± 11 mL CH₄ g ST⁻¹ (sin pretratamiento), 313 ± 9 mL CH₄ g ST⁻¹ (hexano) y aproximadamente 249 mL CH₄ g ST⁻¹ (metanol:hexano). La condición utilizada fue mesofílica (33°C). Se observó un aumento en la producción de biometano solo con el pretratamiento con hexano en *N. oculata*. Después, Córdova *et al.* (2017) realizaron una recopilación de estudios sobre el rendimiento de biometano utilizando microalgas como sustrato y enzimas en el pretratamiento, en este caso no se menciona la fuente del consorcio

bacteriano. Los rendimientos de metano fueron los siguientes: 1545 mL CH₄ g VS⁻¹ con *Arthrospira máxima* y enzima Lipomod™ 957 (esterasa, proteasa), 415 mL CH₄ g VS⁻¹ con *Chlorella sp.* y enzima hidrolítica de la bacteria *Bacillus licheniformis*, 600 mL CH₄ g VS⁻¹ con *Chlorella vulgaris* y enzima alcalasa 2.5 L (proteasa), 150 mL CH₄ g VS⁻¹ con *C. vulgaris* y enzima viscozyme (β-glucanasa, celulasa, xilanasa), 1425 mL CH₄ g VS⁻¹ con *Scenedesmus obliquus* y enzima Depol™ 40 L (celulasa, endogalactouronasa), 521 mL CH₄ g VS⁻¹ con *Botryococcus braunii* y extracto enzimático de *Anthracoxyllum discolor* 1000 U/L. Candía-Lomelí, (2018) realizó un ensayo de producción de biometano utilizando un lodo granular anaerobio de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas tequileras, como sustrato utilizó biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus*. Utilizó dos pre-tratamientos el primero con PHA (peróxido de hidrógeno alcalino) pH 1 y el segundo con NaOH 4M en condiciones mesofílicas (37 °C). Los resultados obtenidos con PHA fueron de 320.6 mL CH₄ g VS⁻¹, el porcentaje de metano fue de 70.5% del rendimiento teórico de CH₄. Con NaOH 4M, se obtuvo 227 mL CH₄ g VS⁻¹ y corresponde a un 67.5% del rendimiento teórico. El inóculo utilizado fue aclimatado con glucosa y acetato, después a un pH de 7 a 9 (condiciones alcalinas). Los perfiles de producción de metano se ajustaron al modelo de Gompertz modificado. Sakarika & Kornaros, (2018) realizaron un ensayo sobre el rendimiento de biometano utilizando un lodo mesofílico de una planta de tratamiento de aguas residuales y como sustrato biomasa de *Chlorella vulgaris* sin pre-tratar en condiciones mesofílicas (35 °C) obteniendo un rendimiento de 360.9 ± 20.2 mL de CH₄ g VS⁻¹. Con macroalgas, Astorga *et al.* (2019) realizaron un ensayo sobre la producción de biometano utilizando como sustrato macroalgas cultivadas en aguas residuales urbanas y como fuente de microorganismos excreta de cerdo en condición mesofílica (35°C) por 40 días, de lo cual obtuvieron una producción de 152.7 mL CH₄ g SV⁻¹, se observó una fase de adaptación de 14 días, una fase exponencial del día 14 al 26. En estudios recientes, Mounghmoon *et al.* (2020), estudiaron el cultivo de microalgas en agua residual de un digestor de biogás de estiércol de pollo para reducir los nutrientes y producir glicolato de manera eficiente. En este

estudio se cultivaron dos cepas de microalgas (*Acutodesmus sp.* AARL G023, *Chlorella sp.* AARL G049) y dos consorcios de microalgas en diluciones de 0.5 veces (W50), 0.75 veces (W75) y agua residual sin diluir (W100). Los resultados mostraron que el consorcio de microalgas con aguas residuales sin diluir (WCW100) estaba formado por *Leptolyngbya sp.* (30,4%), *Chlorella sp.* (16,1%) y *Chlamydomonas sp.* (52.2 %), el cual reveló la mayor productividad de biomasa con $0.064 \pm 0.015 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y la mayor productividad de glicolato con $5.12 \pm 0.48 \text{ mmol L}^{-1}\text{d}^{-1}$. El cultivo de microalgas redujo efectivamente los niveles de nitrógeno amónico ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) y fósforo reactivo soluble (PRS) en las aguas residuales en $43.5 \pm 1.3 \%$ y $49.6 \pm 6.9 \%$. Además, WCW100 mostró la mayor productividad de biogás con $1.44 \pm 0.07 \text{ mL g}^{-1}\text{d}^{-1}$ y el mayor contenido de metano con $58.3 \pm 6.0 \%$ v/v. Este estudio indica que existe un potencial definido para usar aguas residuales sin diluir en la producción de biomasa de microalgas y producción de glicolato que puede reducir el volumen de aguas residuales y aplicarse como materia prima para la producción de metano. Hu *et al.* (2021) evaluaron el rendimiento de metano, las eficiencias de conversión de energía, la cinética de digestión y deshidratabilidad del digestato, con la microalga filamentosa *Tribonema sp.*, como una alternativa de sustrato para la digestión anaeróbica (DA) usando como inóculo estiércol porcino. El uso de la microalga mejoró sustancialmente el rendimiento de metano, la cinética de DA y la deshidratabilidad del digestato. El rendimiento del metano osciló entre 2 y 27.4 % con una eficiencia de conversión de energía del 81% con la relación de mezcla inóculo: sustrato 1:1 (base SV). La cinética de DA mejoró según lo indicado por el aumento de las constantes de velocidad de hidrólisis y la disminución del tiempo de retraso. Por otra parte, la alta productividad de biomasa de las microalgas ($0.441 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) en digestato líquido permitió la producción sostenible de bioenergía a través del reciclaje de nutrientes. Oleszek y Krzemińska, (2021) investigaron la influencia del pre-tratamiento ultrasónico de la biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Parachlorella kessleri*, especies de pared rígida y alto contenido de proteínas, y su factibilidad en la producción de biogás. El inóculo utilizado se obtuvo de una planta local de biogás a gran escala.

Los ensayos anaeróbicos se llevaron a cabo por lotes de biomasa de algas pre-tratadas y no tratadas en condiciones mesofílicas (37° C), de acuerdo con el método descrito por Oleszek y Kozachok (2018). Los fermentadores fueron eudiómetros con un volumen de 1 L. Los sólidos totales (ST) de la masa en fermentación se estableció en 3%, en una relación de sólidos volátiles inóculo a sustrato de 2:1. El volumen de biogás del blanco se restó del volumen de biogás de la muestra analizada y se expresó en rendimiento de biogás en condiciones normales (1013 mbar, 273 K). Los resultados mostraron que el pre-tratamiento ultrasónico de la biomasa rica en carbohidratos de *P. kessleri* provocó una disminución significativa en el contenido de carbohidratos complejos estructurales y cambios positivos en el curso del proceso de fermentación del metano. Por el contrario, el pre-tratamiento de biomasa alta en proteína de *C. vulgaris* influyó negativamente en la fermentación de metano debido a la agregación de proteínas y la formación de un grupo NH₂ libre. El rendimiento final de biogás de *P.kessleri* aumentó de $483.0 \pm 7.2 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$ a $502.4 \pm 5.7 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$, y el rendimiento de metano disminuyó ligeramente de $296.2 \pm 4.3 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$ a $291.1 \pm 8.4 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$. El rendimiento final de biogás y metano de *C. vulgaris* disminuyó ligeramente de $491.1 \pm 16.6 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$ a $487.3 \pm 48.5 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$, y de $304.6 \pm 8.2 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$ a $297.6 \pm 24.2 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ ST}$. Conversión (1 dm³=1L). González *et al.* (2022) evaluaron la producción y calidad de biogás a partir de cuatro biomásas: microalgas (BM), sorgo (S), rastrojo de maíz (RM), aceite de colza (AC) en un proceso de digestión anaerobia realizado en dos reactores discontinuos (6 L) y planta piloto (1.5 m³) agitado. La digestión anaerobia se llevó en condiciones mesofílicas de 30 a 35 días. La relación inóculo/sustrato fue de 1:1–2:1. Los rendimientos de metano fueron de 306, 345, 419 y 740 NL kg SV⁻¹ para BM, RM, S y AC, respectivamente, en pruebas de laboratorio, mientras que en plantas piloto fueron de 182, 151, 397 y 655 NL kg SV⁻¹. El porcentaje de CH₄ en el biogás fue del 49 al 60 %. Se aplicaron modelos de primer orden, Gompertz Modificado y Cono para evaluar los parámetros cinéticos sobre el metano producido en los ensayos discontinuos y en planta piloto, obteniendo un excelente ajuste.

2.11 Modelos cinéticos aplicados en la digestión anaerobia (DA).

Los modelos cinéticos se han utilizado en procesos de DA para comprobar las hipótesis iniciales, evaluar los resultados experimentales, controlar y predecir el rendimiento del proceso, son un paso necesario para el diseño y dimensionamiento adecuado de los sistemas de DA. Gurung y Oh (2012) aplicaron el modelo de Gompertz modificado para evaluar la producción de biometano utilizando como sustrato Estrella de mar y lodos de una planta de digestión de lodos anaerobios (pH 8.2) con una proporción 1:1, a 35°C, obtuvieron el máximo potencial de CH₄ de 617 mL de CH₄ g SV⁻¹ al final del tiempo de incubación (60 días), con un tiempo de adaptación (λ) de 25.44 días y una R_{max} de 18.43 mL de CH₄ g SV⁻¹. Zhao *et al.* (2019) evaluaron la producción de biometano con el modelo de Gompertz Modificado, utilizaron residuos de cocina (KW) y lodos activados de un digester anaerobio mesofílico (308 K= 34.85°C) (WAS) en una proporción WAS: KW 1:2, obteniendo un volumen final de 1324 a 1480.7 mL de CH₄ g SV⁻¹ con una dosificación de bentonita de 1-2 g g SV⁻¹ con un tiempo de retención de 40 días. Las constantes obtenidas con el ajuste del modelo fueron una R_{max} de 37-50.9 mL de CH₄ d⁻¹, λ de 4.3-1.4 días y una R² > 0.991. Guo *et al.* (2020) evaluaron el efecto de la DA de estiércol de cerdo con lignito a 37 °C, utilizó el modelo cinético Gompertz que se ajustó bien en la producción de metano (R²≥0.9863), este modelo de ecuación estructural indicó que el lignito tiene un efecto indirecto en la producción acumulada del metano. Pečar y Goršek (2020), emplearon el modelo cinético de primer orden y Gompertz modificado para simular la fermentación anaeróbica de una mezcla de gallinaza con aserrín con paja de trigo pre-tratada donde el R² más bajo del modelo cinético de primer orden fue 0.9780 y para el modelo Gompertz 0.9713, esta diferencia se explica por la aceleración inmediata de la concentración de metano al inicio de la fermentación. López-Aguilar *et al.* (2021) evaluaron la producción de biometano del sustrato suero lácteo e inóculo adaptado (excreta de vaca) en una proporción 1:1, la producción fue analizada con tres modelos (Aumento exponencial máximo,

Gompertz Modificado y Richards Modificado), obteniendo el mejor ajuste con Gompertz Modificado. El rendimiento acumulado fue de 11-15 cm³ (11-15 mL) de CH₄ g SV⁻¹ en un tiempo de retención de 75 días a temperatura ambiente (5-27°C). Las constantes de Gompertz Modificado fueron una R_{max} de 0.2793-0.5448 cm³ CH₄ g SV⁻¹, y una fase lag que varió entre 4.9 y 16.4 días en proporciones 1:1 y 1:2, respectivamente. (Conversión 1 cm³ = 1 mL de gas). Ali *et al.* (2020) realizaron un análisis comparativo del rendimiento en la producción de metano de 5 modelos cinéticos (Gompertz, Logístico, Richards y redes neuronales de primer orden) para predecir la tasa de producción de metano en estiércol de ganado. Las variables fueron el tiempo de fermentación, la temperatura de digestión, la temperatura del biogás, la temperatura del ambiente, el pH y la tasa específica de producción de biogás. Los contenidos de sólidos volátiles del estiércol de vaca y oveja fueron (77.6 y 64.7 %, respectivamente), mientras que el potencial de producción de metano fue mayor con estiércol de vaca (673.44 mL CH₄ g VS⁻¹) que con el de oveja (320.32 mL CH₄ g VS⁻¹). Los coeficientes de determinación (R²) de todos los modelos coincidieron con los datos experimentales. Meneses-Quelal *et al.* (2022) evaluaron la codigestión anaeróbica de estiércol de cuy (GP) con residuos orgánicos andinos: amarantos (AM), quinua (QU) y trigo (TR) en digestores discontinuos en condiciones mesófilas durante 40 días. El mayor rendimiento de producción de metano se obtuvo en una proporción GP:AM (25:75) y GP:QU (25:75) con 341.86 mL CH₄ g VS⁻¹ y 341.05 mL CH₄ g VS⁻¹ respectivamente. En la cinética de producción de metano se utilizaron 5 modelos: Gompertz modificado, ecuación logística, transferencia, Cono y Richards. En sus resultados indicaron que el modelo de Cono se ajustó mejor a los valores experimentales con los datos R²: 0.999 y RMSE (Error de raíz cuadrada media) de 1.16 mL CH₄ g VS⁻¹.

2.12 Balance energético

Un balance energético se entiende como una contabilidad del aporte y del consumo de energía en un sistema. Algunas investigaciones realizadas en la producción de biometano nos mencionan el balance energético, en la mayoría se tiene un balance negativo, sin embargo, nos dan un panorama de lo que se ha realizado y como se pueden mejorar las investigaciones. Alzate *et al.* (2013) mencionan que, para que un proceso sea autosuficiente en energía, la concentración mínima de microalgas debe de ser de 84 g ST kg⁻¹ y 97 g ST kg⁻¹ para *Nannochloropsis* A y B, respectivamente, esto es por la diferencia en su productividad específica de metano. En el caso de *Nannochloropsis* A fresca, es probable que la concentración recolectada típica sea inferior a 10 gST L⁻¹, por lo que es necesario aplicar un fuerte proceso de concentración para lograr la concentración de hidrólisis térmica recomendada. Este proceso de pre-concentración implica un sobrecoste de operación. En el caso de la *Nannochloropsis* B extraída, el proceso de extracción lipídica implica una concentración previa a un nivel similar al requerido para la hidrólisis térmica, sin sobrecoste energético, se entiende que esta biomasa es un subproducto después de la extracción de lípidos. Villaraldo-Falfán (2018), menciona que los valores energéticos que obtuvo en la producción de biogás con desechos citrícolas no llegaron a satisfacer la energía consumida, puesto que la energía producida solo cubre del 5.1 al 8% de la energía utilizada en el pre-tratamiento, en este caso el aumento de temperatura a 90°C por 1 h. Panigrahi y Kumar-Dubey, (2019) evaluaron un pre-tratamiento electroquímico con electrodos de grafito para pre-tratar los desechos de jardín previo a la digestión anaeróbica. Para determinar el mecanismo de deslignificación se investigaron las propiedades físicas y químicas de los desechos de jardín sin tratar y pre-tratados. En la digestión anaeróbica subsiguiente de desechos de jardín pre-tratados, se logró la producción final de biogás de 446 mL gSV⁻¹ en comparación con los desechos de jardín no tratados de 287 mL gSV⁻¹ en el día 35 de la digestión anaeróbica. Una ganancia neta de

energía de 4.75 kJ gSV⁻¹ (energía de salida de 5.73 kJ gSV⁻¹ – energía de entrada de 0.98 kJ gVS⁻¹) y una ganancia neta de US\$ 7.4 por 1 tonelada de desechos de jardín. Otros estudios, han investigado la viabilidad del uso de estiércol de animales para la producción de biogás para generación de energía limpia en términos de ganancia de energía. Chen *et al.* (2021) evaluaron la factibilidad de convertir el estiércol de pollo para la producción de biogás en la región de Rabat-Salé-Zemmour-Zaïr de Marruecos. La digestión anaerobia del estiércol de pollo ha llamado mucho la atención en Marruecos debido a la creciente demanda de pollo y huevos. La bioconversión de estiércol de pollo en biogás podría reducir la cantidad de estiércol de pollo y generar energía limpia. El resultado mostró que hubo una ganancia de energía de 1350 MJ por tonelada de estiércol de pollo seco que se convirtió en biogás. La ganancia de energía aumentó a 3996 MJ/tonelada de estiércol de pollo seco cuando se añadió paja de trigo para co-digerir. Considerando la conversión de biogás obtenido para la generación de electricidad, hubo electricidad adicional para la venta después de restar la electricidad consumida dentro de la industria avícola. En comparación con la combustión conjunta, la pirólisis y la gasificación, la digestión anaerobia del estiércol de pollo fue superior en términos de ganancia de energía. Carrillo-Reyes *et al.* (2021) evaluaron el efecto de diferentes temperaturas (35 °C y 55 °C) y tiempos de retención hidráulica (HRT) de 15 y 30 días en la producción de metano a largo plazo utilizando agregados de bacterias y microalgas no pre-tratados como materia prima. Esto debido a que se quiere observar si hay mejora en la ruta de obtención de biogás, sin agregar el pre-tratamiento a la biomasa a través del aumento de la temperatura. Los resultados observados es que la transición termófila de inóculo a mesófila al agregado microalga-bacteria incrementó 1.7 veces la producción de metano (0.41 m³ CH₄ kg SV⁻¹) a TRH de 30 d. Se observó una disminución sustancial en la diversidad de la comunidad microbiana presente en el reactor anaeróbico, cuando se aplicaron condiciones termófilas, lo que explica que es necesario el largo período de adaptación. La evaluación del balance de energía mostró una relación de energía neta positiva cuando el

digestor se operó con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 30 días. Se logró una relación máxima de energía neta de 1.5 a temperatura mesófila. Este estudio demostró, basado en datos experimentales, que la digestión de microalgas con un TRH de 30 d favorece la autosostenibilidad energética en plantas de tratamiento de aguas residuales con microalgas.

3. JUSTIFICACIÓN

Veracruz es uno de los seis estados principales productores de tilapia (*Oreochromis niloticus*), no se tiene información de si los efluentes descargados tienen algún tratamiento, pues dependiendo de las tasas de recambio y la materia orgánica disuelta puede causar contaminación por nutrientes (eutrofización). Además de que los productores tienen un importante desafío: el requisito de la evaluación de impacto ambiental (EIA), que es obligatoria para todas las operaciones que pueden causar daño a un ecosistema o poner en peligro una o varias especies, esta tiende a ser costosa para los pequeños productores de tilapia y muchas veces dificulta el establecimiento de nuevas operaciones (FAO, 2021). Con lo expuesto anteriormente, se buscan alternativas para utilizar los efluentes acuícolas para obtener un beneficio, uno de ellos es utilizar estos efluentes como medio para cultivar microalgas. Organismos unicelulares que tienen por naturaleza incorporar nutrientes como fósforo y nitrógeno, así como una variedad de minerales, tienen una alta tasa de crecimiento y utilizan la energía del sol, motivo por el que se consideran una alternativa de tratamiento. Por otro lado, la biomasa de microalgas producto del cultivo puede utilizarse en la producción de biogás (metano y dióxido de carbono), obteniendo como subproducto un lodo que puede utilizarse como fertilizante. El biogás está tomando fuerza por ser un combustible renovable al ser extraído de fuentes de materia orgánica producto de desechos (domésticos, agroindustriales, aguas residuales) y por la consiguiente disminución de los combustibles fósiles, por lo tanto obtenerlo de esta forma puede ser utilizado como insumo energético para la calefacción, generación de

electricidad, o combustible para el transporte, en dado caso puede usarse para generar energía dentro de la misma granja (el consumo de energía eléctrica aunado con el alimento son de mayor costo) o puede ser comercializado. Por lo cual, evaluar el cultivo de microalgas en un efluente residual acuícola proveniente de un cultivo de tilapia para la producción de biogás y su eficiencia en la remoción de compuestos nitrogenados en granjas experimentales de tilapia del ITBOCA, en la zona centro del estado de Veracruz es de suma importancia para dar un plus a las granjas acuícolas en lo relacionado al impacto ambiental, social y económico.

4. HIPÓTESIS

Los efluentes residuales acuícolas contienen una gran cantidad de compuestos nitrogenados, por lo que se espera que las microalgas cultivadas en este medio sean capaces de incorporarlos y que presenten una composición bioquímica adecuada para producir biogás.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar el cultivo de microalgas en un efluente residual acuícola proveniente de un cultivo de tilapia, su eficiencia en la remoción y aprovechamiento de nutrientes, composición bioquímica y la biomasa producida como sustrato en la producción de biometano.

Objetivos específicos

1. Evaluar la producción y productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloris oculata* cultivadas en un efluente residual acuícola en dos condiciones de irradiancia.
2. Determinar la eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y DQO en cultivos microalgales.
3. Determinar la composición bioquímica de las microalgas producidas.
4. Evaluar la producción de biometano durante la digestión anaerobia de biomasa microalgal-excreta de cerdo como sustrato-inóculo en condición mesofílica.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en dos etapas 1) Etapa I: caracterización del efluente, propagación de cepas, ensayo en 6 litros, análisis bioquímico y producción de biomasa en 200 litros 2) Etapa II: caracterización del sustrato e inóculo bacteriano y ensayo de producción de biogás. La Etapa I se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías y Laboratorio de Alimento vivo del Instituto Tecnológico de Boca del Rio (Fig. 6). La Etapa II se realizó en el área destinada al proyecto biogás-biometano del Laboratorio de Ecología y Química (Fig. 7) del Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVER).



Fig. 6 Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías.



Fig. 7 Área destinada al proyecto biogás-biometano del Laboratorio de Ecología y química del ITVER.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño experimental

Etapa I: Cultivo de microalgas en fotobiorreactores 6 L.

El diseño experimental para las cinéticas de crecimiento fue un análisis factorial 2⁴, donde los factores fueron: A) microalgas, B) medios de cultivo, C) Irradiancia y D) fases de crecimiento, todo por triplicado (Tabla 3). En el diseño del análisis bioquímico, remoción de compuestos, producción y productividad de biomasa, se utilizó un modelo 2³ por bloques al azar (Tabla 4), los factores fueron A) microalgas, B) Irradiancia y C) fases de crecimiento. Las determinaciones se realizaron en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria en fotobiorreactores de 6 L.

Tabla 3. Diseño para las cinéticas de crecimiento.

A	B	C	D	Variable respuesta
Microalgas	Medio	Irradiancia (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Fase de crecimiento	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	MBB	40.5	EXP EST	1,2,3
	Efluente	40.5	EXP EST	1,2,3
	MBB	72.9	EXP EST	1,2,3
	Efluente	72.9	EXP EST	1,2,3
<i>N. oculata</i>	MBB	40.5	EXP EST	1,2,3
	Efluente	40.5	EXP EST	1,2,3
	MBB	72.9	EXP EST	1,2,3
	Efluente	72.9	EXP EST	1,2,3

MBB: Medio Basal Bold

Tabla 4. Diseño experimental para el cultivo de microalgas.

A) Microalgas	<i>C. Vulgaris</i>				<i>N. oculata</i>			
B) Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	40.5		72.9		40.5		72.9	
C) Fase de crecimiento	EXP	EST	EXP	EST	EXP	EST	EXP	EST
Variables respuesta								
Proteínas (%)	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Carbohidratos (%)								
Lípidos (%)								
Producción (g L^{-1})								
Productividad ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)								
Eficiencia de remoción (η , %)								

Etapa II. Digestión anaerobia

En el ensayo de producción de biometano se utilizó un modelo 2^2 por bloques al azar, donde los factores son A) microalgas y B) Fases de crecimiento, la combinación de factores se muestra en la la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental para la digestión anaerobia.

Microalgas	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Nannochloris oculata</i>	
Fase de crecimiento	EXP	EST	EXP	EST
Biogás	1	1	1	1
(NmL)	2	2	2	2

7.2 Desarrollo experimental

Etapa 1. Las actividades se realizaron en el siguiente orden: 1) Caracterización y elección del efluente residual acuícola, 2) propagación de cepas) 3) evaluación del crecimiento microalgal en dos condiciones de iluminación y medición de parámetros (compuestos nitrogenados, fosfatados y materia orgánica), 5) Determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos, 6) Producción de biomasa en fotobiorreactores de 200 litros con una irradiancia de $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Etapa 2. Las actividades se realizaron en el siguiente orden: 1) caracterización del sustrato e inóculo, 2) pretratamiento del sustrato, 3) Ensayo de producción de biometano por digestión anaerobia en un tiempo de 60 días por ensayo.

7.3 Etapa I. Caracterización del efluente y cultivo de microalgas.

7.3.1 Caracterización y elección del efluente residual acuícola.

Se recolectaron dos efluentes de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *O. niloticus* rocky mountain var. blanca) de los estanques de tilapia de los invernaderos ubicados en el Instituto Tecnológico de Boca del Río (Fig. 8). El efluente fue sedimentado por 24 horas, se retiró la materia orgánica y microalgas, se filtró a través de una columna con tela poliéster en la parte superior y con papel filtro y malla de $100 \mu\text{m}$ en el fondo. Después del filtrado se realizó la esterilización química utilizando 1 mL de cloro comercial por litro de efluente, para la neutralización se utilizó 0.5 gramos de Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por litro de efluente, manteniendo durante 24 h aireación constante para poder realizar la siembra (Fig. 9). El efluente fue caracterizado antes y después de la esterilización, determinando la concentración inicial de $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ y PO_4^{3-} usando un Fotómetro Multiparamétrico HANNA (Modelo HI83099).



A



B

Fig. 8 A) Efluente residual de tilapia *Oreochromis niloticus* (ETE1), B) Efluente crudo 2 de *O. niloticus* rocky mountain var. Blanca (ETE2).

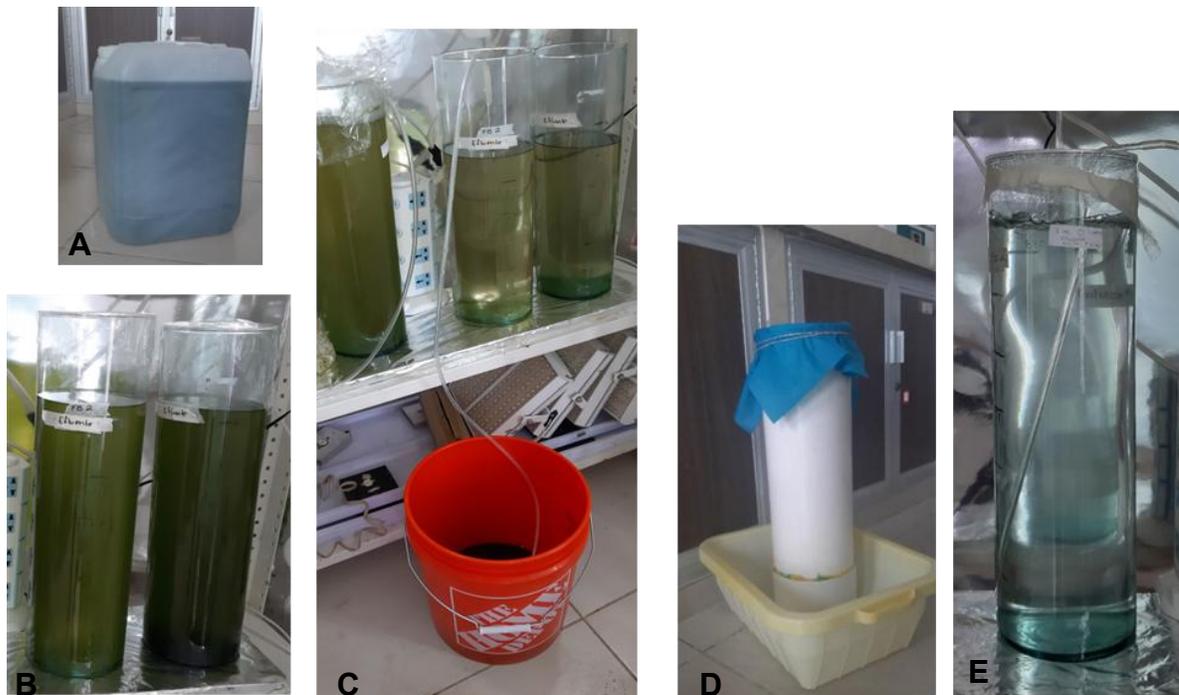


Fig. 9 A) Bidón con efluente, B) Sedimentación, C) Retiro de materia orgánica/microalgas, D) Filtro, E) Efluente filtrado y esterilizado.

7.3.2 Cultivo de microalgas.

Se utilizaron dos cepas de microalgas dulce acuícolas: *Chlorella vulgaris*, y *Nannochloris oculata* (adaptada al agua dulce), ambas pertenecientes a la colección de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías.

Los cultivos se iniciaron con inóculos de ambas microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata* en un volumen de 200 mL en medio Basal Bold (Stein, 1979) a 22 ± 2.0 °C (Fig. 10), se cultivaron bajo un fotoperiodo de 24 horas de luz, sin aireación en una cámara de luz a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la irradiancia fue calculada de las mediciones obtenidas con un luxómetro (Medidor digital de luminosidad) STEREN HER-408. Posteriormente se hizo el pase de cepas a diferentes volúmenes de crecimiento (500, 1000 y 6000 mL), con una siembra inicial de 1×10^6 cél mL⁻¹, llevando a cabo conteos de densidad celular, utilizando una cámara de Neubauer ISOLAB por el método de Pica-Granados *et al.* (2004).



Fig. 10 Mantenimiento y propagación de cepas.

7.3.3 Determinación de las fases de crecimiento.

Las microalgas se sembraron en un volumen de 1000 mL, con una siembra inicial de 1×10^6 cél mL⁻¹, en efluente donde se agregó metales traza y vitaminas para el óptimo crecimiento de las microalgas y medio Basal Bold (MBB) como control (Fig. 11), el conteo de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer ISOLAB por el método de Pica-Granados *et al.* (2004), a 22 ± 1.0 °C, con un fotoperíodo de 24 horas luz en dos condiciones de iluminación: $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

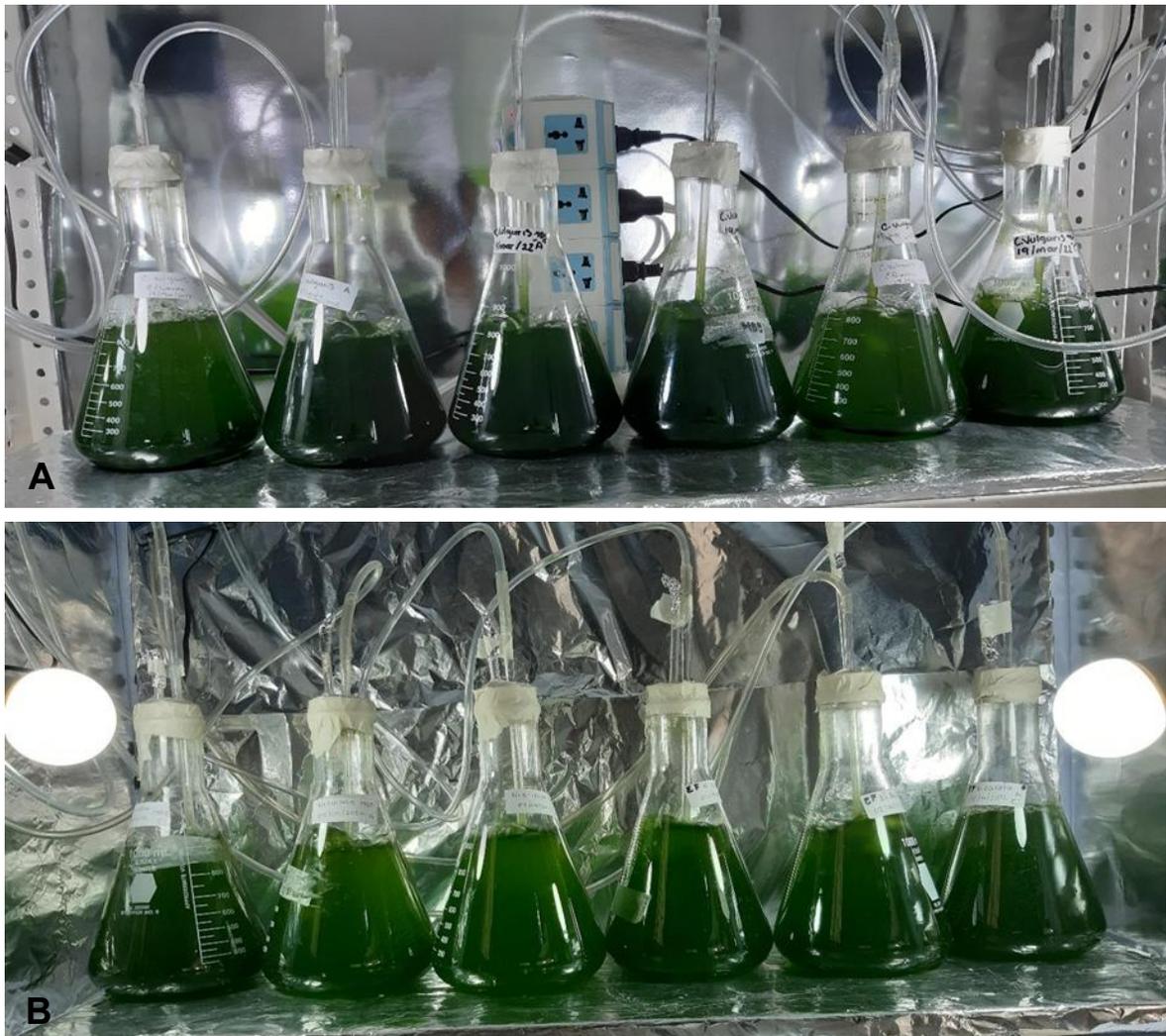


Fig. 11 Cinéticas de crecimiento A) *Chlorella vulgaris*, B) *Nannochloris oculata*.

7.3.4 Cultivo de microalga en fotobiorreactores de 6 L para determinación de eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados y composición bioquímica.

Los fotobiorreactores (unidades experimentales) se llenaron con 6 L de efluente del cultivo de tilapia previamente caracterizado y esterilizado. Después se inoculó con 1×10^6 cel mL^{-1} (Fig. 12), el inóculo se tomó de los cultivos continuos preparados anteriormente en matraces de 1 L en fase exponencial con las microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata*, de acuerdo con el diseño experimental

propuesto. El volumen del inoculo se determinó por medio de conteo celular mediante la cámara de Neubauer (Pica-Granados *et al.* 2004), utilizando la ecuación Ec.5.

$$V_2 = (C_1 \cdot V_1) / C_2 \dots\dots\dots \text{Ec.5}$$

Dónde:

V₁: Volumen de operación en el reactor (6000 mL)

C₁: Densidad celular inicial en el reactor (1x10⁶ cel mL⁻¹)

V₂: Volumen de inoculo requerido para el reactor (mL)

C₂: Densidad celular del inoculo en el momento de realizar la inoculación al reactor (cel mL⁻¹).



N. oculata

C. vulgaris

Fig. 12 Cultivo de microalgas en fotobiorreactores de 6 L.

Para determinar la eficiencia de remoción de los compuestos nitrogenados, fosfatados y material orgánico, se tomaron muestras de 50 mL cada tercer día después de iniciado el cultivo para su caracterización y evaluar la cantidad de NO₂-N, NO₃-N, NH₃-N, PO₄⁻³ y DQO removidos del efluente de tilapia por las

microalgas. La muestra se centrifugó a 3500 rpm por 15 min y se utilizó el sobrenadante. Los reactivos utilizados para medir los parámetros (nitrito, amonio, nitrato, fosfato y DQO) se muestran en la Tabla 6. Para las lecturas en el fotómetro se utilizaron cubetas de vidrio HI731315, en las cuales se colocó la muestra y se agregó el reactivo correspondiente, se agitó suavemente y se colocó en el Fotómetro Multiparamétrico HANNA HI83099, previamente calibrado con agua desionizada (Fig. 13). En el caso del DQO, se tomaron 2 mL de muestra y fueron vertidos en los viales con rosca que contenían el reactivo líquido en una inclinación de 45 grados, después se cerraron. Para el blanco se utilizó agua desionizada. Se utilizó un reactor COD marca HANNA modelo HI 839800, que fue precalentado y una vez alcanzado los 150°C se insertaron los viales y se dejó por 2 horas. Al término de este tiempo se apagó y se dejó enfriar por 20 min, se retiraron y se colocaron cuidadosamente (sin agitar) en una parrilla para que se enfriaran a temperatura ambiente, después se leyó en el Fotómetro Multiparamétrico. El pH fue medido con un potenciómetro Science MED BM-25CW (MICROPROCESSOR pH/mV METER).

Tabla 6. Reactivos utilizados para medir los parámetros nitrito, amonio, nitrato, fosfato y DQO.

Parámetro	Reactivos	Rangos aplicados a acuicultura
Amonio	HI93715A-0 HI93715B-0	Rango medio
Nitrito	HI93707-01	Rango bajo
Nitrato	HI93728-01	----
Fosfato	HI93717A-0 HI93717B-0	Rango alto
DQO	HI93754B-25	Rango medio

La eficiencia de remoción (η , %) expresada en % se determinó con la ecuación Ec.6:

$$\eta = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec.6}$$

Donde:

η : Eficiencia de remoción (%).

P_i : Concentración inicial (día 0) del compuesto.

P_f : Concentración final (cada tercer día del cultivo).

Se realizaron cosechas de 800 mL en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, las cuales fueron conservadas en refrigeración a 4°C hasta su uso.



A



B



D



C

Fig. 13 Procedimiento para calcular la eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y DQO. A) Cosecha, B) Centrifuga, C) Sobrenadante y D) Medición de parámetros.

7.3.5 Determinación del contenido, producción y productividad de biomasa.

Se utilizaron muestras de 800 mL (previamente cosechadas) por triplicado de todos los tratamientos en la fase exponencial y estacionaria correspondiente a la cinética de crecimiento, estas se conservaron en refrigeración por 5 días, la microalga fue sedimentada por lo que se retiró el medio y el concentrado de microalgas se vació en tubos falcón de 50 ml, este fue centrifugado en una centrífuga CRM GLOBE CENTRIFICIENT IV a 3500 rpm por 15 minutos, después se retiró el exceso de medio y se conservó la pastilla de microalgas. Para el filtrado se utilizó una membrana (papel filtro) de 110 mm de diámetro marca Whatman, esta fue secada en una estufa (incubadora) ARSA AR 130-D a 60°C por 24 horas y llevada a peso constante, utilizando una balanza analítica VELAB VE-210, el peso fue registrado (peso membrana seca, Pms en mg) (Fig. 14).



Fig. 14 Proceso para la determinación de peso seco, A) Muestras, B) Centrífuga, C) Filtrado, D) Biomasa seca.

El filtro fue colocado en un filtro de vacío conectado a una bomba de vacío ROCKER 800, una vez terminado la membrana fue colocada en la estufa de secado por 24 horas a 60°C, y llevado a peso constante. El peso seco de la membrana más microalgas filtradas (P_{mms} en mg) fue registrado. Se aplicó la siguiente ecuación (Ec. 7) para determinar la biomasa en base seca (BS) en mg mL⁻¹.

$$PB = \frac{[P_{mms} (mg) - P_{ms} (mg)]}{800 \text{ ml}} \quad \text{Ec. 7}$$

Para la productividad se utilizó la Ec. 8.

$$PBD = PB / DC \quad \text{Ec. 8}$$

Donde:

PB: Producción de biomasa (mg L⁻¹)

PBD: Productividad de biomasa (mg L⁻¹ d⁻¹)

Pms: Peso de membrana seca (mg)

Pmms: Peso de membrana seca con microalgas (mg)

DC: Días de cultivo (d)

7.3.6 Análisis bioquímico

7.3.6.1 Determinación de lípidos por el Método Soxhlet

La cantidad de biomasa obtenida de cada tratamiento (fotobioreactores) previamente seca y pesada (m) se sometió a una extracción con una mezcla cloroformo/metanol (1:2 v/v) por el método Soxhlet (Halim *et al.* 2012). Los matraces de extracción se lavaron y enjuagaron utilizando agua destilada. Se secaron durante 24 horas a 60 °C. Una vez seco se registró el peso del matraz (M_1). Se colocó el matraz en el sistema Soxhlet y se adicionó la mezcla del

solvente al matraz. Se realizó la extracción de la muestra, realizando 5 reflujos a una velocidad de goteo constante. Una vez terminada la extracción se recuperó la mayor cantidad de solvente por destilación. Se realizó el secado del matraz con la grasa en una estufa a 60 °C durante 24 horas, se dejó enfriar dentro de desecador adicionado de sílica gel y finalmente se registró el peso (M₂). Se realizaron los cálculos pertinentes para conocer la cantidad de lípidos extraídos con la ecuación Ec. 9.

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{M_2 - M_1}{m} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 9}$$

Donde:

m: peso de la muestra

M₁: tara del matraz

M₂: peso matraz con grasa

7.3.6.2 Determinación de proteínas

Curva de calibración

Se preparó una solución madre a una concentración de 200 mg L⁻¹ de albúmina de huevo (ovalbúmina, marca Golden Bell ®), utilizando en este caso 100 mg de albúmina aforados a 500 mL de agua destilada, las mediciones se realizaron a 595 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific Marca Genesys Modelo 10 S UV-VIS obteniendo como resultado la Tabla 7, Fig. 15 y Fig. 16.

Tabla 7. Elaboración de la curva de calibración de proteínas.

Tubo	Solución de albúmina (mL)	NaOH 0.1 N (mL)	Concentración (µg mL ⁻¹)	Lectura (595 nm)
Blanco	0.000	1.000	0	0.000
1	0.005	0.995	1	0.020
2	0.010	0.990	2	0.030
3	0.020	0.980	4	0.016
4	0.030	0.970	6	0.030
5	0.050	0.950	10	0.062
6	0.100	0.900	20	0.101
7	0.200	0.800	40	0.212
8	0.300	0.700	60	0.299
9	0.500	0.500	100	0.368
10	1.000	0.000	200	0.659

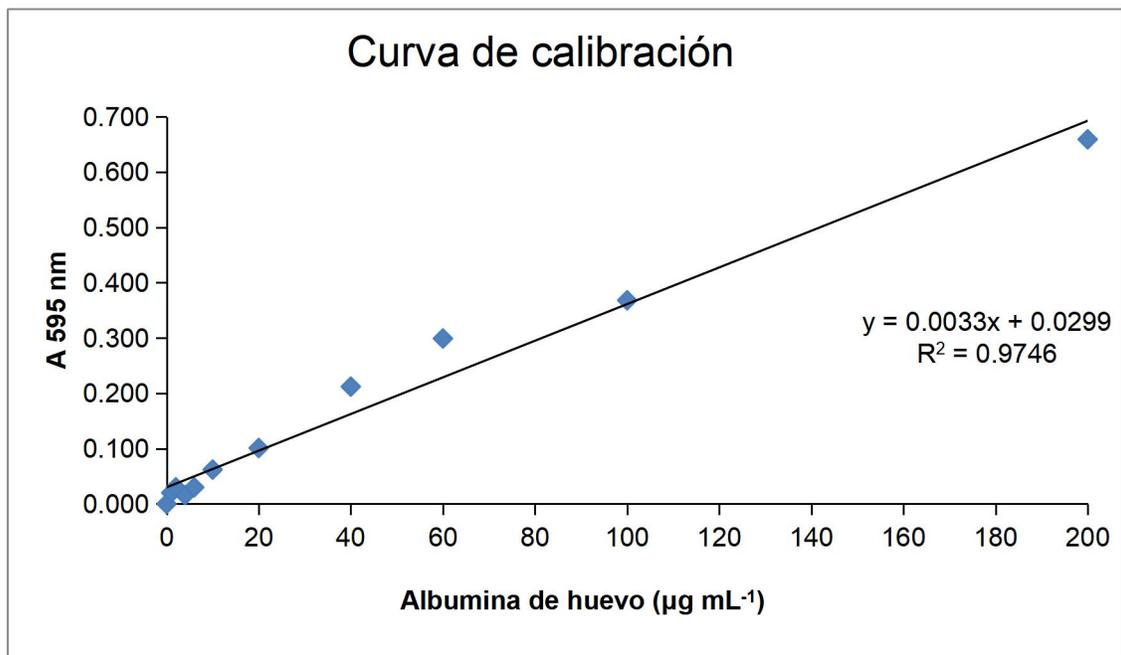


Fig. 15 Curva de calibración de proteínas utilizando la absorbancia (595 nm) como variable dependiente.

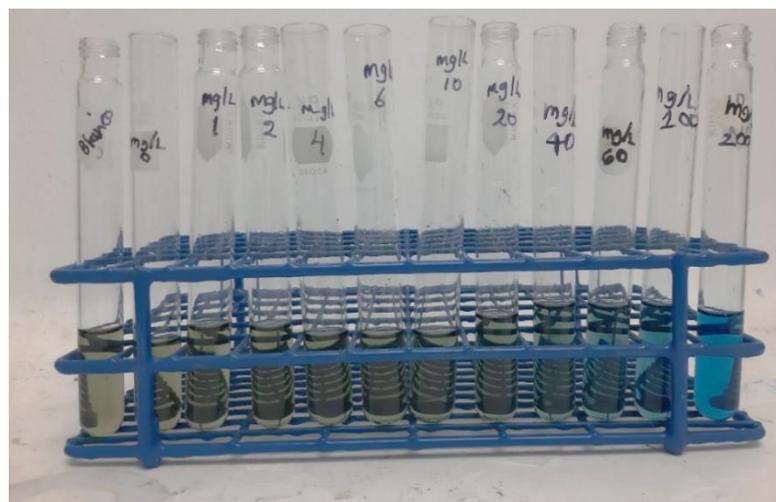


Fig. 16 Muestra de los tubos de ensayo para la calibración de proteínas

Procedimiento para el cálculo de proteínas por el método de Bradford modificado (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

Se realizó la cosecha de la biomasa microalgal, un volumen de 800 mL, se sedimentó por 6 días a 4°C en un refrigerador, una vez sedimentada la microalga, se retiró el sobrenadante y se centrifugó en una centrifuga CRM GLOVE CENTRIFICIENT IV a 3500 rpm por 15 minutos, después se homogeneizó a 50 mL y se congeló a -20°C hasta su uso. En el momento de la determinación de proteína se descongeló, se homogeneizó y se utilizaron 2 mL de microalga concentrada por triplicado, las cuales fueron puestas en tubos de ensayo lisos, se agregó 5 mL de solución de NaOH 0.1 N y se incubó a 100° C por 20 min en un baño María THERMOSTHAT WATER BATH, marca CIVEQ®, modelo HH-2, una vez terminado el tiempo se sacaron los tubos de ensayo y se enfriaron en agua con hielo, una vez frío se sonicó a 40 kHz en 2 ciclos de 5 min en un sonicador marca BRANSON, modelo 1800. Una vez terminado, la muestra se vació en tubos ependdorf y se centrifugó a 10000 rev/min por 10 minutos a 10° C en una centrifuga de mesa refrigerada PIFIT 1681. Después el sobrenadante se agregó a tubos de ensayo de rosca limpios, de este sobrenadante se tomó 1 mL y se agregó a otro tubo de ensayo, a este último se agregó 5 mL de la solución de Bradford, se esperó 10 min, se vertió en celdas de cuarzo y se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Marca Genesys Modelo 10 S UV-VIS (Fig. 17). Nota: El blanco se preparó con 1 mL de NaOH 0.1 N más 5 mL de solución de Bradford, se esperó 5 minutos y se leyó en el espectrofotómetro. El cálculo del contenido de proteínas se realizó por medio de la ecuación de la recta (Fig. 15).

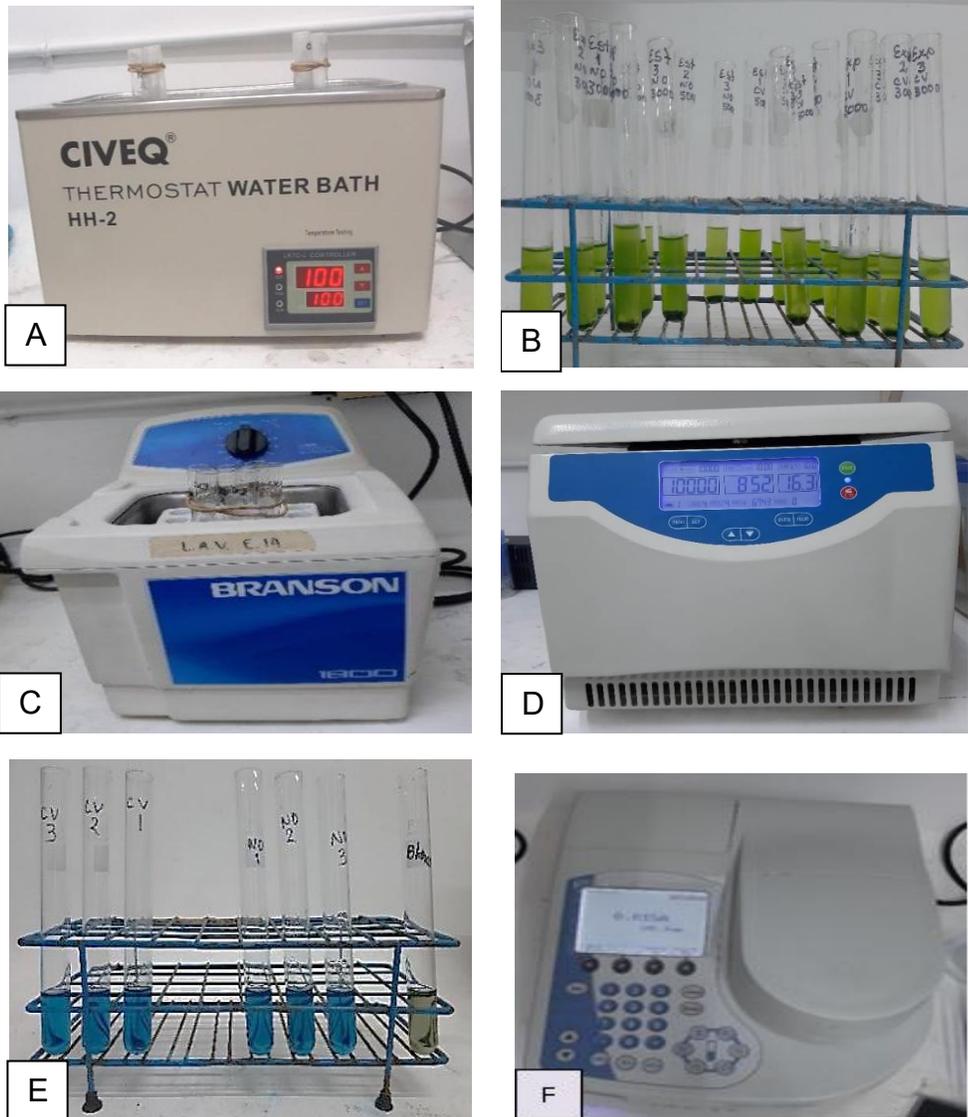


Fig. 17 Procedimiento para el cálculo de proteínas. A) Baño María, B) Microalgas después de la incubación a 100°C, C) Sonicador, D) Centrifuga, E) Microalgas con la solución de Bradford, F) Espectrofotómetro.

7.3.6.3 Determinación de carbohidratos

Para la medición de carbohidratos, primero se realizó la curva de calibración (Tabla 8, Fig. 18 y Fig. 19), preparando una solución madre de glucosa (Dextrosa anhidra) a una concentración de 100 mg L⁻¹.

Tabla 8. Curva de calibración de carbohidratos utilizando Glucosa Anhidra.

Tubo	Agua destilada (μL)	Solución de glucosa (μL)	Concentración (μg mL ⁻¹)	H ₂ SO ₄	Absorbancia (315 nm)	
Blanco	0	0	0	0	3	0
1	975	25	2.5	3	0.149	
2	950	50	5	3	0.150	
3	900	100	10	3	0.195	
4	850	150	15	3	0.207	
5	800	200	20	3	0.237	
6	700	300	30	3	0.348	
7	400	600	60	3	0.541	

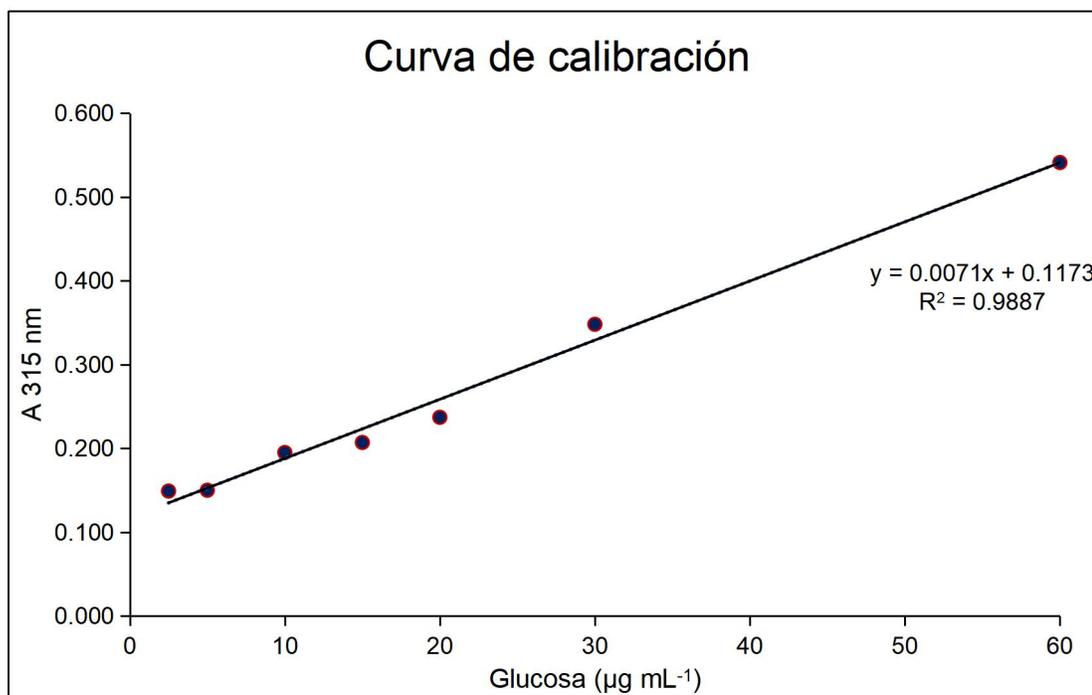


Fig. 18 Curva de calibración de carbohidratos utilizando la absorbancia (315 nm) como variable dependiente.

Se inicia agregando el agua destilada, después la solución de glucosa, y por último se agrega el H_2SO_4 concentrado, se incuba por 5 minutos a $90^\circ C$, se enfría en agua con hielo, posteriormente se lee en el espectrofotómetro.



Fig. 19 Tubos de ensayo de la calibración de carbohidratos.

Procedimiento para la medición de carbohidratos en microalgas

Como la muestra de microalgas estaba en congelación ($-20^\circ C$), se descongeló, se agitó hasta homogeneizar. Se utilizó el método ácido sulfúrico-UV (López-Legarda *et al.* 2017). Se vertieron 2 mL de microalga concentrada por triplicado en tubos de ensayo, se agregó 1 mL de H_2SO_4 1M, se sonicó por 5 minutos y se agregó 4 mL más de H_2SO_4 1M. Los tubos de ensayo se incubaron a $100^\circ C$ por 60 minutos, al término se retiraron y se enfriaron, después la muestra se vació en tubos eppendorf y se centrifugó a 4000 rev/min por 15 minutos a $10^\circ C$. Una vez terminado, el sobrenadante se vertió en tubos de ensayo limpios, previamente etiquetados de rosca, en este punto se realizó una dilución 1:6 (utilizando 0.5 mL de sobrenadante y 2.5 mL de agua destilada, dando un total de 3 mL), una vez realizada la dilución se tomó 1 mL y se vertió en otros tubos de ensayo lisos, se agregó 3 mL de H_2SO_4 concentrado dando un total de 4 mL (Fig. 20). Por último,

se incubó a 90 °C por 5 minutos, se enfrió, después se vertió en celdas de cuarzo y se leyó a 315 nm. Los cálculos se realizaron con la ecuación de la recta obtenida



con la curva de calibración.

Fig. 20 Cálculo de carbohidratos. A) Microalga con H₂SO₄ 1M, B) Sonicador, C) Baño María a 100°C, D) Microalgas después de la incubación a 100°C, E) Baño María a 90°C, F) Espectrofotómetro.

7.3.7 Producción de biomasa

Se realizó la producción de biomasa en fotobiorreactores de 200 L, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 21), con iluminación de $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condición con la cual se obtuvo mayor producción, productividad y mayor cantidad de carbohidratos en *C. vulgaris* y *N. oculata*.



Fig. 21 Cultivo de microalgas en fotobiorreactores de 200 L.

La cosecha se realizó en fase exponencial y estacionaria, para la floculación se utilizó NaOH 1M, en un tiempo de 40 minutos aproximadamente, una vez sedimentada la microalga se guardó en recipientes de plástico de 1 L y se congeló a -20°C hasta su utilización (Fig. 22).



Fig. 22 Microalga concentrada.

7.4 Etapa II. Producción de biometano

7.4.1 Inóculo bacteriano

El inóculo utilizado fue un lodo procesado de una fermentación de excreta de cerdo, mejor conocido como purín (Durazno-Coronel, 2018) que fue recolectado el 10 de Septiembre de 2022 en el rastro Obradores de Medellín, en el municipio de Medellín, Veracruz. Este se mantuvo a temperatura ambiente en un bidón de 20 L (Fig. 23).



Fig. 23 Lodo procesado de una fermentación de excreta de cerdo.

7.4.2 Caracterización del sustrato e inóculo.

La caracterización para obtener los ST, SV, humedad y cenizas se realizó de acuerdo con el método gravimétrico establecido en el manual del equipo AMPTS II Light. Se utilizaron crisoles que fueron llevados a peso constante, fueron colocados en una estufa a 105 °C por 12 horas, al término de este tiempo se pusieron en una estufa de vacío Gallenkamp, y el peso se registró con una balanza analítica Mettler H80. La biomasa de las microalgas *N. oculata* y *C. vulgaris*, fue descongelada y homogeneizada. Se pesaron 3 g de biomasa de microalgas (líquida) en los crisoles, se colocaron en la estufa a 105°C por 12 horas, se registró el peso, después se colocaron en una mufla marca Phoenix, modelo MRB3-1200-01 a 550 °C por 5 horas (Fig. 24). Una vez terminado los crisoles se colocaron en un desecador de vidrio que fue utilizado en el proceso, el desecador se dejó entreabierto por 15 minutos. Terminado el registro de los datos se procedió a calcular la masa de la muestra fresca, seca, cenizas, agua perdida y sólidos volátiles a partir de las ecuaciones Ec. 11, Ec. 12, Ec. 13, Ec. 14 y Ec. 15, por último se realizó el cálculo de los porcentajes de sólidos totales (ST), humedad, cenizas, sólidos volátiles (SV) en base seca y base húmeda (Ec. 16, Ec. 17, Ec. 18, Ec. 19 y Ec. 20), los resultados se muestran en la Tabla 9.

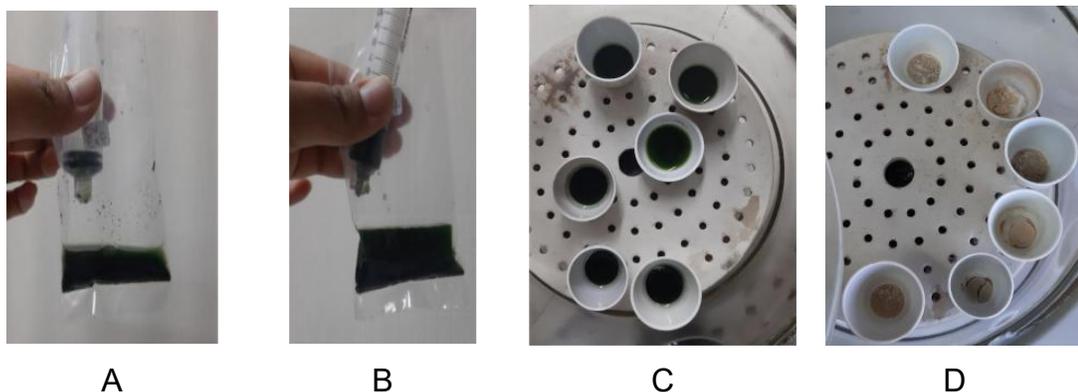


Fig. 24 A) y B) Microalga, C) Crisol con microalga líquida, D) Crisol con cenizas.

Masa de la muestra fresca: $m_{mf} = (m_m + m_{cv}) - m_{cv}$ Ec. 11

Masa de la muestra seca: $m_{ms} = (m_{t1} + m_{cv}) - m_{cv}$ Ec. 12

Masa de cenizas: $m_c = (m_{t2} + m_{cv}) - m_{cv}$ Ec. 13

Masa de agua perdida: $m_{H_2O} = m_m - m_{ms}$ Ec. 14

Masa de sólidos volátiles: $m_{SV} = m_{ms} - m_c$ Ec. 15

Donde:

m_{mf} = masa de la muestra fresca, g.

m_m = masa de la muestra, g.

m_{cv} = masa del crisol vacío, g.

m_{ms} = masa de la muestra seca, g.

m_{t1} = masa de la muestra tratada a 105°C por 12 h, g.

m_c = masa de cenizas, g.

m_{t2} = masa de la muestra tratada a 500°C por 5 h, g.

m_{H_2O} = masa de agua perdida, g.

m_{SV} = masa de sólidos volátiles, g.

% p/p Sólidos Totales: $ST (\%) = \frac{m_{ms}}{m_m} \times 100$ Ec. 16

% p/p Humedad: $Humedad (\%) = \frac{m_{H_2O}}{m_m} \times 100$ Ec. 17

% p/p Cenizas: $C (\%) = \frac{m_c}{m_{ms}} \times 100$ Ec. 18

% p/p Sólidos Volátiles base seca: $SV_{bs} (\%) = \frac{m_{SV}}{m_{ms}} \times 100$ Ec. 19

% p/p Sólidos Volátiles base húmeda: $SV_{bh} (\%) = \frac{m_{SV}}{m_m} \times 100$ Ec. 20

Donde:

ST (%) = Sólidos Totales, %.

m_{ms} = masa de la muestra seca, g.

m_m = masa de la muestra, g.

Humedad (%) = Humedad, %.

m_{H_2O} = masa de agua perdida, g.

C (%) = Cenizas, %.

m_c = masa de cenizas, g.

SV_{bh} = Sólidos Volátiles en base húmeda, %.

SV_{bs} = Sólidos Volátiles en base seca, %.

m_{sv} = masa de sólidos volátiles, g.

Tabla 9. Datos de caracterización empleados para la base de cálculo.

Muestra	Cv EXP	Cv EST	No EXP	No EST	Inóculo 1	Inóculo 2
Colecta	10-oct-22	24-ago-22	01-oct-22	10-oct-22	10-sep-22	10-sep-22
Caracterización	01-nov-22	01-nov-22	25-nov-22	25-nov-22	14-oct-22	15-dic-22
% ST	6.38	3.58	8.66	5.99	0.60	0.82
% SV _{bs}	63.15	77.55	69.01	67.35	90.82	76.62
% SV _{bh}	4.03	2.78	5.97	4.04	0.56	0.63
% Humedad	93.62	96.42	91.34	94.01	99.40	99.18
% Cenizas	36.85	22.45	30.99	32.65	9.18	23.38

Cv: *C. vulgaris*, No: *N. oculata*, bs: base seca, bh: base húmeda.

7.4.3 Pretratamiento del sustrato (biomasa microalgal)

Con los datos obtenidos en la Tabla 9, se procedió a pretratar el sustrato (biomasa de microalgas), el cual fue ultrasonificado (pretratamiento utilizado para romper la pared de la célula microalgal) con un suministro de energía de 10,000 kJ kgST⁻¹ (Alzate *et al.* 2012) en un equipo ULTRASONIC PROCESSOR Cole Parmer CPX75 EUA a 750 watts, con una amplitud de onda de 38%, sin control de temperatura (Tabla 10), el tiempo fue calculado con la Ec. 21 (Alzate *et al.* 2012).

Tabla 10. Datos utilizados en la ultrasonificación.

Microalga	Volumen (L)	Temperatura inicial (°C)	Final	Tiempo (s)	Amplitud (%)
Cv Exp	0.50	18.6	25.0	425	38
Cv Est	0.50	15.5	19.8	239	38
No Exp	0.25	13.7	22.0	289	38
No Est	0.35	22.3	27.6	280	38

Cv: *C. vulgaris*, No: *N. oculata*

$$E = \frac{P*t}{V*ST} \quad \text{Ec. 21}$$

Donde: E, es la energía suministrada en kJ kg ST⁻¹; P, watts; t, tiempo de ultrasonificación (s); V, volumen de muestra (mL) y ST, concentración de sólidos totales (g ST kg⁻¹)

7.4.4 Digestión anaerobia

Realizado el pretratamiento, los biorreactores de 2 L fueron llenados a 1 L (asumiendo 1 L = 1 kg) (Tabla 11) por duplicado, después se mezcló el sustrato y el inóculo (Fig. 25), los biorreactores fueron colocados en la unidad de incubación del equipo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS) II Light (Fig. 26), donde se realizó el barrido de los reactores con nitrógeno con 48% de CO₂. El baño María se ajustó a una temperatura de 35° C.

Tabla 11. Cantidad de sustrato e inóculo.

Reactores	Sustrato (g)	Inóculo (g)	Total (g)
Cv Exp	121.76	878.24	1,000
Cv Est	167.28	832.72	1,000
No Exp	95.00	905.00	1,000
No Est	135.00	865.00	1,000
Blanco (Cv)	Agua destilada	878.24	1,000
Blanco (No)	Agua destilada	905.00	1,000

Cv: *C. vulgaris*, No: *N. oculata*



Fig. 25 Mezcla de sustrato e inóculo.



Fig. 26 Equipo AMPTS II Light

La digestión anaerobia fue llevada a 60 días, la producción de biometano fue registrada en mililitros normalizados (NmL), es decir, en condiciones estándar a 0°C y 1 atm. Al final de la DA se midió el amonio del digestato utilizando el kit de Amonio AMMONIA $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ marca API y para el pH, un potenciómetro marca ecoTestr pH2. Mo

7.4.5 Potencial bioquímico de metano (PBM) teórico

Para medir la producción de metano dada por el PBM teórico se utilizó la ecuación de Buswell (Jaramillo-Gutiérrez y Tamayo-Mateus, 2019), la cual se expresa en mL de CH₄ g SV⁻¹.

$$PBM_{teórico}(mLCH_4gSV^{-1}) = \frac{22.4 \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8} \right) 1000}{12n + a + 16b + 14c} \quad \text{Ec. 22}$$

Donde:

n: número de moles de carbono

a: número de moles de hidrógeno

b: número de moles de oxígeno

c: número de moles de hidrógeno

22.4: volumen (L) ocupado por un gas ideal a condiciones estándar de temperatura (273k) y presión (1 atm)

1000: factor de conversión del volumen de L a mL

12, 1, 16, 14: peso molecular del carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno respectivamente.

Las ecuaciones que se utilizaron para carbohidratos, lípidos y proteínas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Número de moles

Ec. general	Carbono	Hidrógeno	Oxígeno	Nitrógeno
	n	a	b	c
Carbohidratos: Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	6	12	6	0
Lípidos: Caprílico (C ₈ H ₁₆ O)	8	16	1	0
Proteína: Ovoalbúmina (C ₆ H ₈ N ₂ O ₄)	16	24	5	4

Sustitución del número de moles en la formula:

$$PBM_{teórico}(mL CH_4 gSV^{-1}) = \frac{22.4 \left(\frac{6}{2} + \frac{12}{8} - \frac{6}{4} - \frac{3(0)}{8} \right) 1000}{12(6) + 12 + 16(6) + 14(0)}$$

7.4.6 Biodegradabilidad

El porcentaje de biodegradabilidad se obtuvo a través de la Ec. 23 (Caporgno *et al.* 2016):

$$\text{Biodegradabilidad (\%)} = \frac{\text{producción de metano medido}}{\text{potencial de metano teórico}} \times 100 \quad \text{Ec. 23}$$

7.4.7 Ajuste al Modelo de Gompertz modificado

La producción de biometano obtenida en 60 días de ensayo se ajustó al modelo de Gompertz modificado (López-Aguilar *et al.* 2021) utilizando la Ec. 24. Las constantes a, b y c se obtuvieron por ajuste de la curva, los residuales al cuadrado y la sumatoria de estos utilizando SOLVER.

$$y = a * e^{-e \left(\frac{b * e}{a} \right) * (c - x) + 1} \quad \text{Ec. 24}$$

Donde:

- a: Rendimiento acumulado de metano (mL CH₄ gSV⁻¹)
- b: Tasa máxima de producción de biogás (mL CH₄ gSV⁻¹)
- c: Tiempo de la fase lag (días)
- x: es el tiempo (días)
- e: exp(1)

7.4.8 Balance energético

Se utilizó el principio de la energía de acuerdo con Cengels & Boles (2012) (Ec. 25). En este análisis se considera que la energía total que entra al sistema es la utilizada para el pre-tratamiento del sustrato (ultrasonido) y la unidad de incubación, mientras que la energía de salida es la energía producida por el biometano generado en la co-digestión sustrato- inóculo, las unidades en las que se realiza la comparación es en kW (kilowatts).

$$E_{\text{entrada}} - E_{\text{salida}} = \Delta E_{\text{total}} \quad \text{Ec. 25}$$

Donde: E_{entrada} es la energía total que entra al Sistema, E_{salida} es la energía total que sale del Sistema y ΔE_{total} es el cambio en la energía total del sistema

La potencia del equipo ultrasónico se calculó de acuerdo a la Ec. 21. Para medir la cantidad de calor que se transmite en la unidad de incubación se utilizó la formula de la calorimetría (Ec. 26) (Arana-Zevallos, 2021) .

$$Q(\text{kcal}) = \Delta T(^{\circ}\text{C}) * c * m(\text{kg}) \quad \text{Ec. 26}$$

Donde: Q es el calor en Kcal, m es la masa del cuerpo en Kg, C es el calor específico del cuerpo, $\Delta T(^{\circ}\text{C})$ es la variación de temperatura; diferencia entre Tf y Ti (temperatura final e inicial).

Para obtener la cantidad de energía producida por el biometano, se consideró que el valor energético de 1 m³ de metano a temperatura y presión estándar tiene un poder calorífico de 9.94 kWh de electricidad y que un generador comercial de electricidad a base de biogás rico en metano tiene una eficiencia de conversión del 30% (Villaraldo-Falfán, 2018).

7.4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza con un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$), que fue aceptado como estadísticamente significativo, se utilizó el programa STATISTICA v 7.0. Todos los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar.

8. RESULTADOS

8.1 Efluente residual

La concentración de $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$, PO_4^{3-} de los dos efluentes muestreados se muestran en el Tabla 13, donde se observan las variaciones en los parámetros después de la esterilización, la cantidad de nitratos disminuyó 74.56 % (ETE1) y un 29.36 % (ETE2), con el nitrito no se observó cambio del efluente filtrado y esterilizado, con el amonio y el fosfato los cambios fueron mínimos, con la DQO se observó una disminución del 2.06 % (ETE1) con respecto a ET1 y del 14.15 % (ETE2) respecto a ET2. En el efluente ETE2 se encontró la menor variación, principalmente con nitrato.

Tabla 13. Parámetros del efluente crudo y estéril.

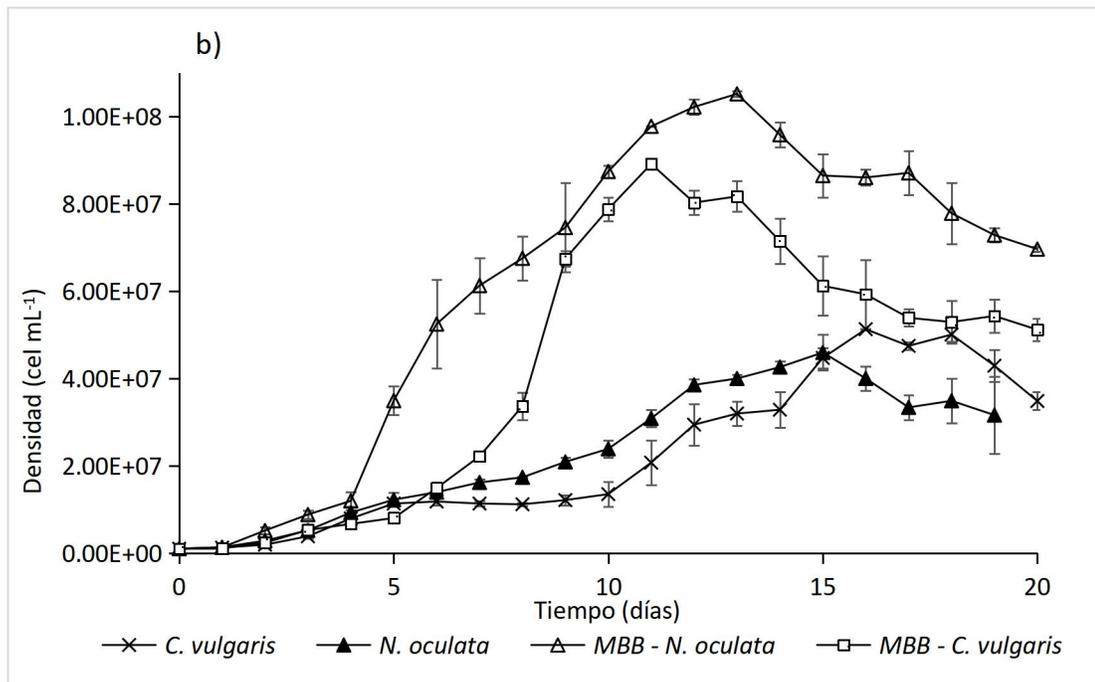
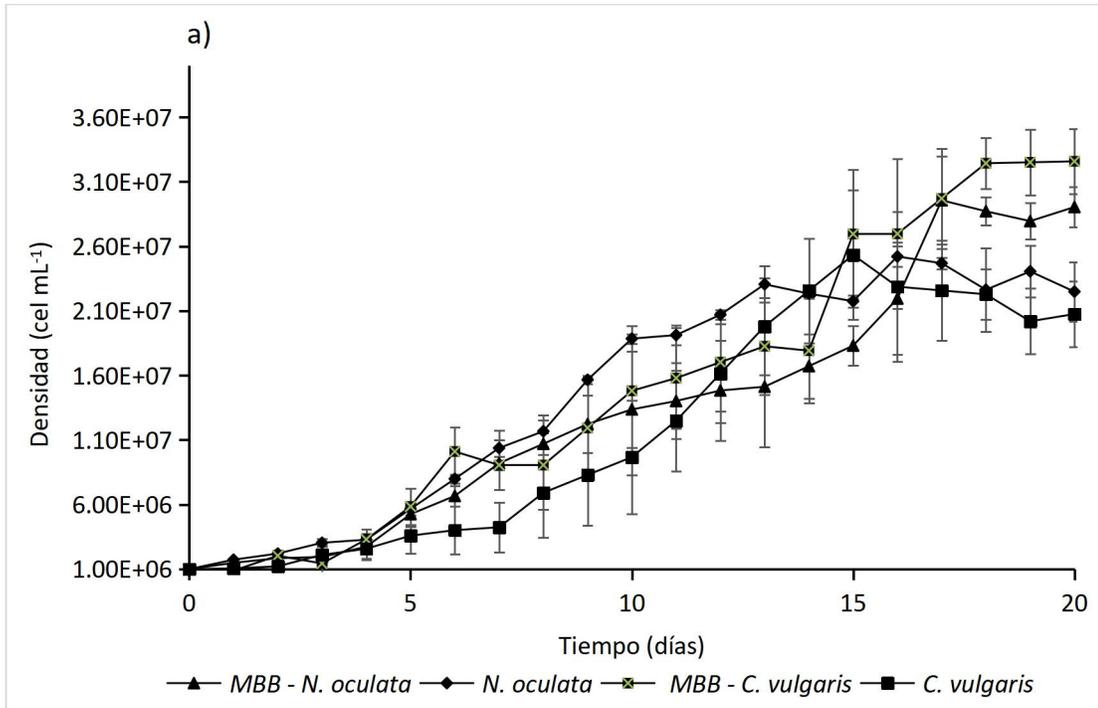
Parámetros	ET1	ETE1	ET2	ETE2
pH	6.9	7.0	6.3	6.7
Nitrato (mg L^{-1})	22.8	5.8	21.8	15.4
Nitrito (mg L^{-1})	0.3	0.3	0.05	0.05
Amonio (mg L^{-1})	0.52	0.70	0.51	0.46
Fosfato (mg L^{-1})	45.0	45.6	19.7	18.3
DQO (mg L^{-1})	340.5	333.5	583.0	500.5

ET1: Efluente crudo de tilapia 1, ET2: Efluente crudo de tilapia 2, ETE: Efluente de tilapia estéril

8.2 Cinética de crecimiento

La fase exponencial y estacionaria de *C. vulgaris* y *N. oculata* a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo en los días 6-10 y 12-16, respectivamente (Fig. 27a). La fase exponencial y estacionaria de *C. vulgaris* y *N. oculata* a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo en los días 5-11 y 12-14, respectivamente (Fig. 27b). Comparando el crecimiento con ambas condiciones de irradiancia y solo con efluente como medio de cultivo (Fig. 27c) se

observa un mayor crecimiento con la condición de iluminación más alta ($72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



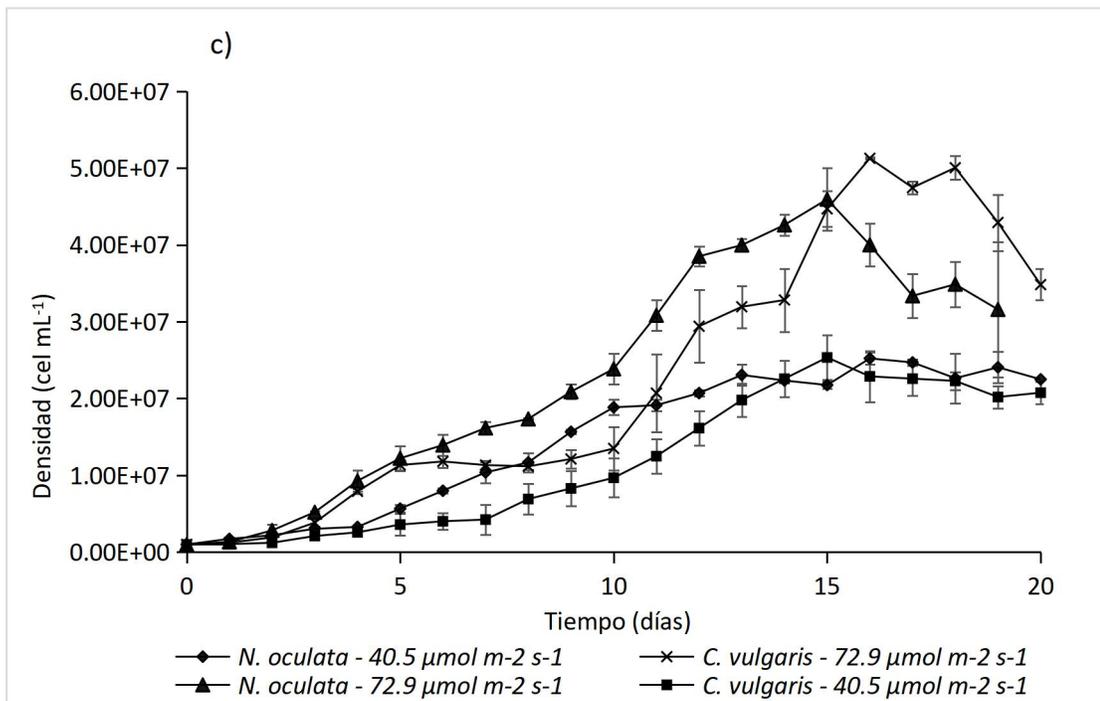


Fig. 27 Cinética de crecimiento de *C. vulgaris* y *N. oculata*, a) $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, b) $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y c) Efluente.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) de la densidad celular, indican que todos los factores probados influyen significativamente ($p < 0.05$) sobre el crecimiento celular de las microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata*, así como la mayoría de las combinaciones a excepción de la combinación Microalga*Medio de cultivo, Microalga*Fase de crecimiento y Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 14, Fig. 28). Se observó que a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no hay diferencia en el crecimiento con ambos medios de cultivo (Fig. 27a), pero la diferencia es notable cuando se utiliza una irradiancia más alta (Fig. 27b). Por lo tanto, el mayor crecimiento fue con MBB a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria, alcanzando concentraciones de $8.17 \times 10^7 \pm 3.50 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $1.05 \times 10^8 \pm 6.36 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente (Tabla 15). Comparando el crecimiento de ambas condiciones de irradiancia con efluente como medio de cultivo (Fig. 27c), se observa un mayor crecimiento a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

alcanzando densidades en fase estacionaria de $4.62 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5$ y $4.45 \times 10^7 \pm 2.33 \times 10^6$ cel mL⁻¹ (Tabla 15) con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente.

Tabla 14. Análisis de varianza de densidad celular de las microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	4.830026E+16	1	4.830026E+16	6846.795	0.000000
{1} Microalga	1.627885E+14	1	1.627885E+14	23.076	0.000195
{2} Irradiancia	1.632512E+16	1	1.632512E+16	2314.164	0.000000
{3} Medio de cultivo	5.307719E+15	1	5.307719E+15	752.395	0.000000
{4} Fase de crecimiento	1.426781E+15	1	1.426781E+15	202.253	0.000000
Microalga*Irradiancia	7.449627E+13	1	7.449627E+13	10.560	0.005025
Microalga*Medio de cultivo	2.273908E+13	1	2.273908E+13	3.223	0.091504
Irradiancia*Medio de cultivo	6.201499E+15	1	6.201499E+15	879.092	0.000000
Microalga*Fase de crecimiento	1.592596E+13	1	1.592596E+13	2.258	0.152441
Irradiancia*Fase de crecimiento	4.630305E+14	1	4.630305E+14	65.637	0.000000
Medio de cultivo*Fase de crecimiento	2.399419E+14	1	2.399419E+14	34.013	0.000025
Microalga*Irradiancia *Medio de cultivo	3.700900E+14	1	3.700900E+14	52.462	0.000002
Microalga*Irradiancia *Fase de crecimiento	1.060332E+12	1	1.060332E+12	0.150	0.703351
Microalga*Medio de cultivo*Fase de crecimiento	2.312594E+14	1	2.312594E+14	32.782	0.000031
Irradiancia*Medio de cultivo*Fase de crecimiento	2.110228E+14	1	2.110228E+14	29.914	0.000051
1*2*3*4	1.169494E+14	1	1.169494E+14	16.578	0.000888
Error	1.128709E+14	16	7.054434E+12		

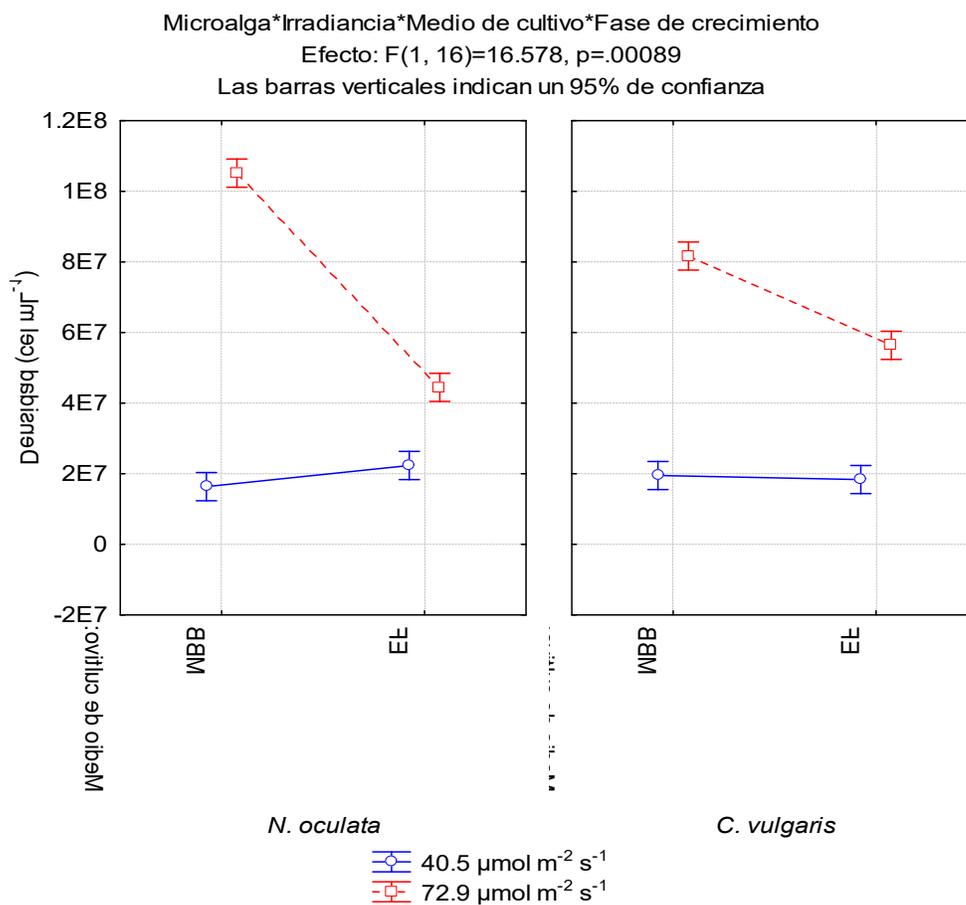


Fig. 28 Representación gráfica de del análisis de densidad celular en fase estacionaria.

Tabla 15. Densidad celular de *C. vulgaris* y *N. oculata* en dos condiciones de irradiancia, dos medios de cultivo y dos fases de crecimiento.

MICROALGA	IRRADIANCIA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	MEDIO DE CULTIVO	FASE DE CRECIMIENTO			
			EXP		EST	
			Densidad celular (cel mL^{-1})			
<i>C. vulgaris</i>	40.5	ET	9.68E+06	$\pm 2.53\text{E}+06$	2.29E+07	$\pm 3.35\text{E}+06$
		MBB	1.46E+07	$\pm 4.24\text{E}+05$	1.95E+07	$\pm 1.20\text{E}+06$
	72.9	ET	1.38E+07	$\pm 4.88\text{E}+06$	4.62E+07	$\pm 2.12\text{E}+05$
		MBB	7.88E+07	$\pm 2.76\text{E}+06$	8.17E+07	$\pm 3.50\text{E}+06$
<i>N. oculata</i>	40.5	ET	1.89E+07	$\pm 5.72\text{E}+05$	2.31E+07	$\pm 8.06\text{E}+05$
		MBB	1.04E+07	$\pm 5.83\text{E}+05$	1.64E+07	$\pm 1.94\text{E}+06$
	72.9	ET	2.39E+07	$\pm 3.46\text{E}+06$	4.45E+07	$\pm 2.33\text{E}+06$
		MBB	8.74E+07	$\pm 1.38\text{E}+06$	1.05E+08	$\pm 6.36\text{E}+05$

8.3 Producción y productividad de biomasa de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

La irradiancia (Fig. 29) y la fase de crecimiento influyeron significativamente en la producción de biomasa ($p=0.00000$), pero la combinación de factores (Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento) no mostró diferencia ($p=0.62655$) (Tabla 16) en el ANOVA. La mayor producción se obtuvo en fase estacionaria a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $0.684 \pm 0.124 \text{ g L}^{-1}$ y $0.718 \pm 0.122 \text{ g L}^{-1}$ con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 16. Análisis de varianza de la producción de biomasa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	3.064348	1	3.064348	568.7776	0.000000
Microalga	0.003891	1	0.003891	0.7223	0.407938
Irradiancia	0.616899	1	0.616899	114.5033	0.000000
Fase de crecimiento	0.331679	1	0.331679	61.5634	0.000001
Microalga*Irradiancia	0.038496	1	0.038496	7.1453	0.016665
Microalga*Fase de crecimiento	0.018928	1	0.018928	3.5133	0.079256
Irradiancia*Fase de crecimiento	0.103780	1	0.103780	19.2627	0.000458
Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento	0.001326	1	0.001326	0.2461	0.626552
Error	0.086202	16	0.005388		

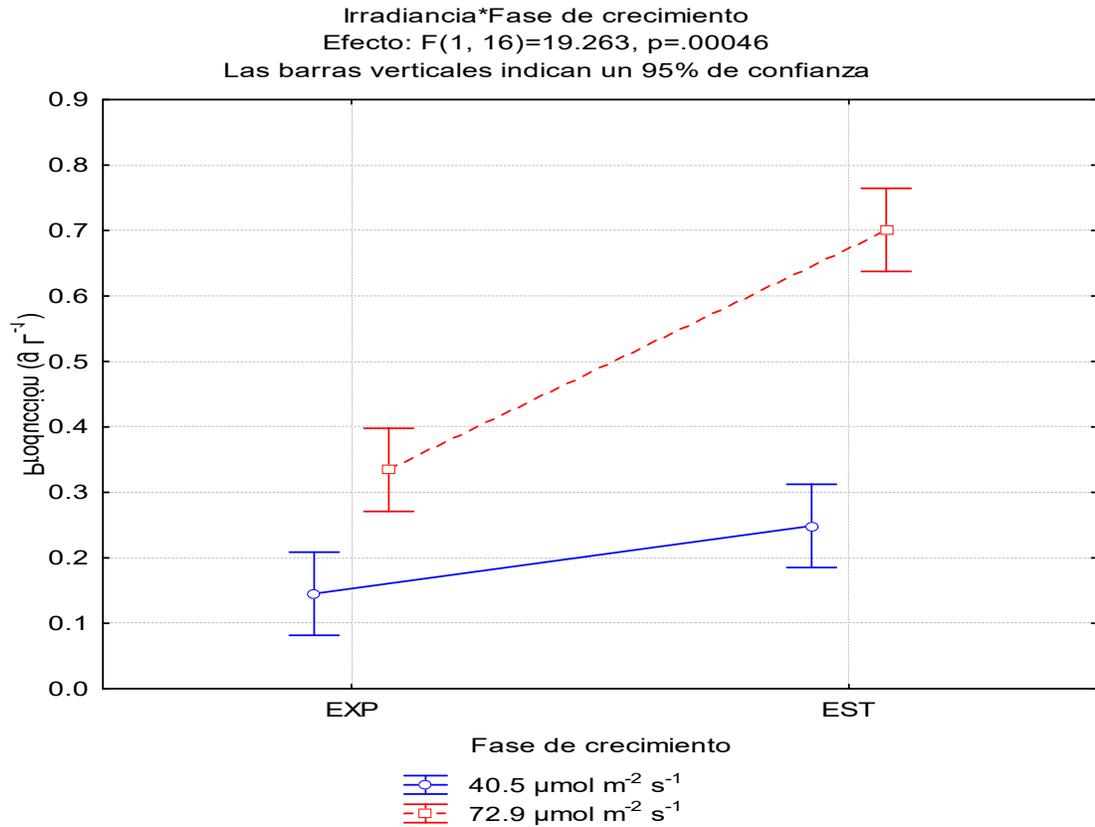


Fig. 29 Efectos principales en la producción de biomasa.

En la productividad de biomasa los factores que influyeron fueron la irradiancia ($p=0.00000$), fase de crecimiento ($p=0.00656$) y la combinación Microalga* irradiancia ($p=0.00890$) (Tabla 17, Fig. 30), obteniendo mayor productividad a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria de $0.043 \pm 0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.048 \pm 0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con *C. vulgaris* y *N. oculata* (Tabla 18), respectivamente. Por lo tanto, se observó la influencia de la irradiancia y la fase de crecimiento sobre la producción y productividad de biomasa siendo mayor a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria con ambas microalgas.

Tabla 17. Resultados del ANOVA de la productividad de biomasa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	0.018244	1	0.018244	581.1458	0.000000
Microalga	0.000127	1	0.000127	4.0296	0.061906
Irradiancia	0.003349	1	0.003349	106.6766	0.000000
Fase de crecimiento	0.000306	1	0.000306	9.7482	0.006567
Microalga* Irradiancia	0.000278	1	0.000278	8.8595	0.008906
Microalga*Fase de crecimiento	0.000077	1	0.000077	2.4427	0.137630
Irradiancia *Fase de crecimiento	0.000132	1	0.000132	4.2071	0.057002
Microalga*Irradiancia *Fase de crecimiento	0.000043	1	0.000043	1.3847	0.256506
Error	0.000502	16	0.000031		

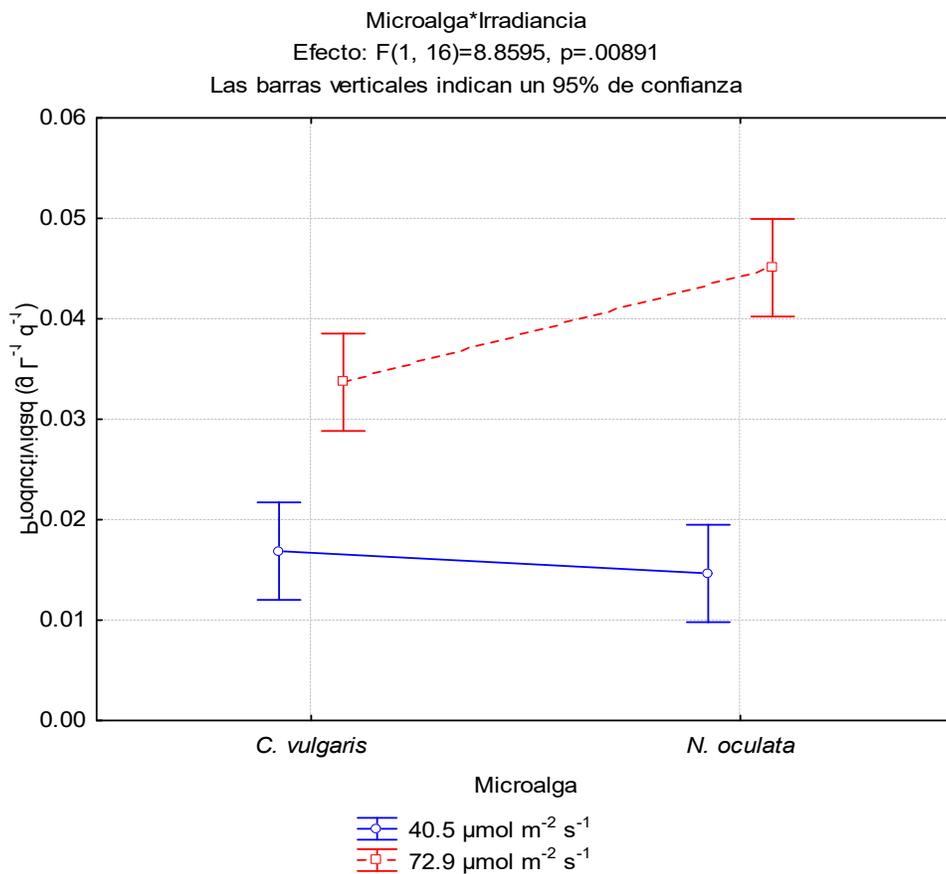


Fig. 30 Efecto de la combinación Microalga*Irradiancia sobre la productividad de biomasa de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Tabla 18. Producción y productividad de biomasa en *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Microalga	Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fase de crecimiento	Producción (g L ⁻¹)	Productividad (g L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	40.5	EXP	0.152 ±0.044	0.015 ±0.004
		EST	0.297 ±0.017	0.019 ±0.001
	72.9	EXP	0.246 ±0.062	0.025 ±0.006
		EST	0.684 ±0.124	0.043 ±0.008
<i>N. oculata</i>	40.5	EXP	0.139 ±0.01	0.014 ±0.001
		EST	0.201 ±0.018	0.015 ±0.001
	72.9	EXP	0.423 ±0.08	0.042 ±0.008
		EST	0.718 ±0.122	0.048 ±0.008

8.4 Eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados en cultivos microalgales.

El comportamiento dinámico de los compuestos nitrogenados, fosfatados y de la materia orgánica, varió en función de la irradiancia empleada ($40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), por lo tanto, algunos compuestos fueron removidos más que otros. A $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se observa remoción del nitrato (Fig. 31a), este se mantiene constante a lo largo del cultivo. Sin embargo, a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observa una tendencia decreciente desde el primer día (Fig. 32a). En el caso del nitrito se observa una tendencia similar con ambas condiciones de irradiancia, aumentando en los primeros días del cultivo y disminuyendo después del día 8, a valores menores que los iniciales (Fig. 31b, Fig. 32b). En cuanto al amonio, se observa una tendencia decreciente en los primeros 8 días con ambas condiciones de irradiancia (Fig. 31c, Fig. 32c), en el caso de *C. vulgaris* se observó un aumento a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 32c). En el caso del fosfato a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa un aumento hasta el día 8 y después empieza a descender lentamente hasta alcanzar el nivel inicial (Fig. 33a), a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ solo se observa un aumento en el día 2 y después la tendencia es decreciente hasta el día 16 (Fig. 34a). Con la DQO a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observa una tendencia decreciente en los primeros 6 días, después se estabiliza hasta el final del cultivo (Fig. 33b), a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observa una tendencia decreciente hasta el día 8 y después se estabiliza hasta el día 16 del cultivo (Fig. 34b). Es importante mencionar que el pH se mantuvo en 6.5 ± 0.4 a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con ambas microalgas, mientras que a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el pH varió de 6.7 ± 0.27 con *C. vulgaris* y de 6.9 ± 0.35 con *N. oculata*.

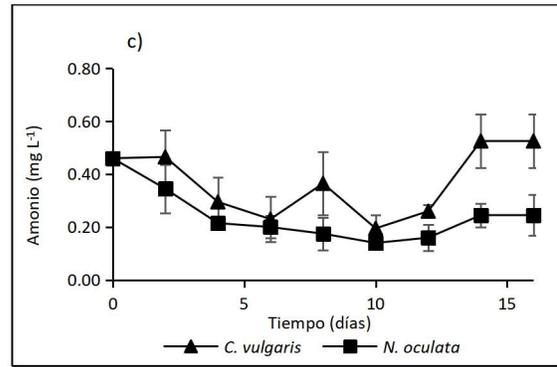
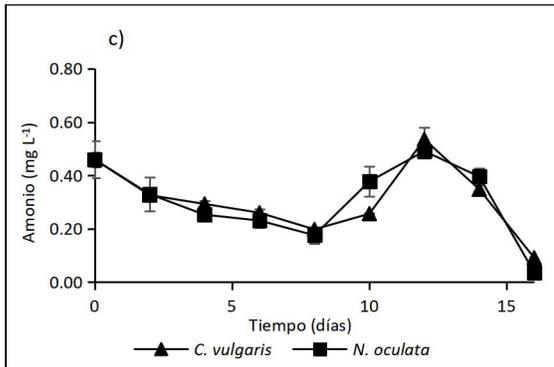
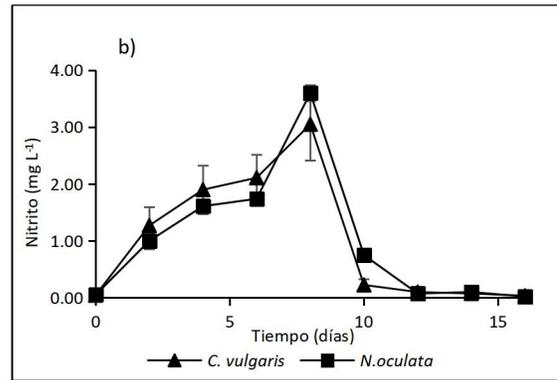
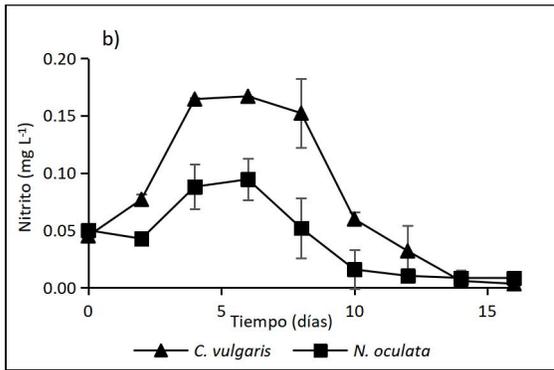
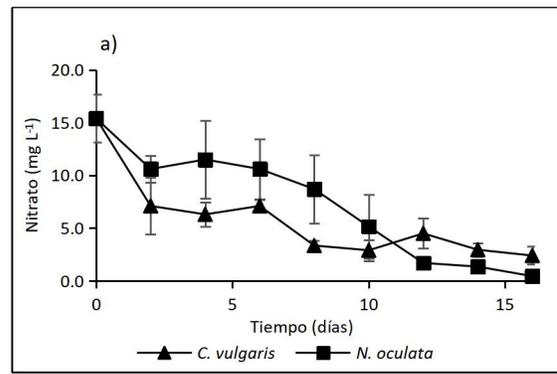
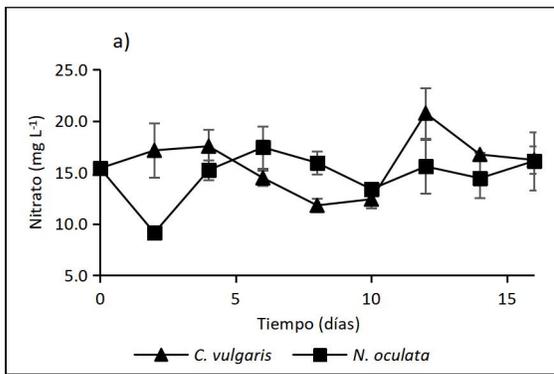


Fig. 31 Comportamiento dinámico de la concentración de a) nitrato, b) nitrito, c) amonio con *C. vulgaris* y *N. oculata* cultivadas en efluente a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Fig. 32 Comportamiento dinámico de la concentración de a) nitrato, b) nitrito, c) amonio con *C. vulgaris* y *N. oculata* cultivadas en efluente a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

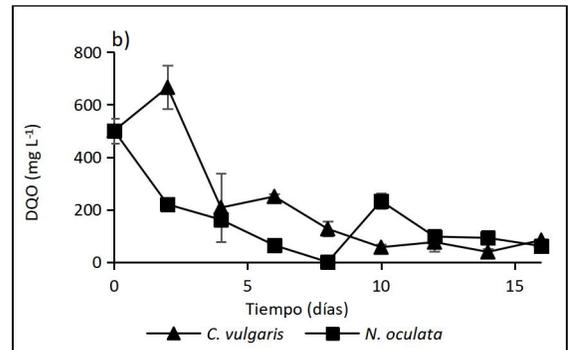
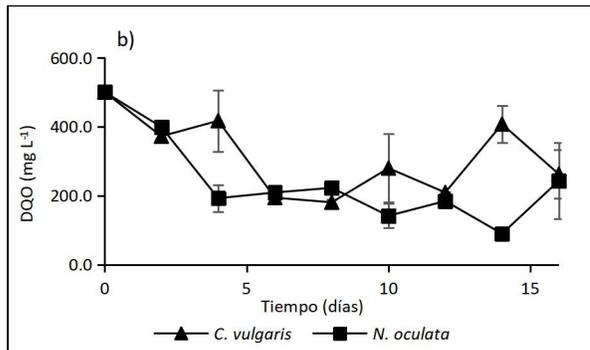
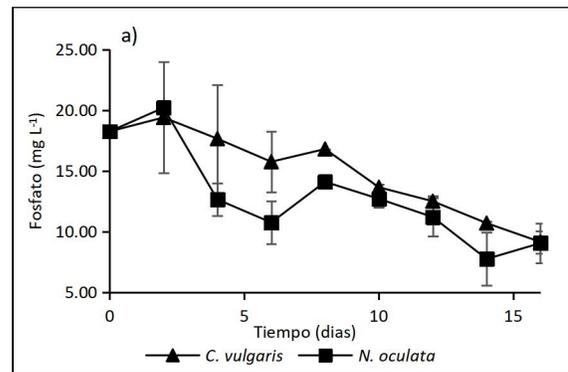
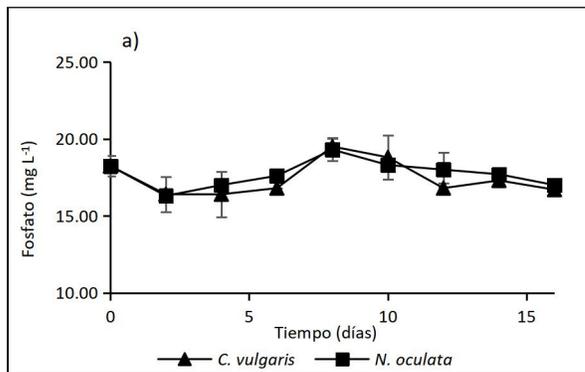


Fig. 33 Comportamiento dinámico de la concentración de a) fosfato y b) DQO con *C. vulgaris* y *N. oculata* cultivadas en efluente a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Fig. 34 Comportamiento dinámico de la concentración de a) fosfato y b) DQO con *C. vulgaris* y *N. oculata* cultivadas en efluente a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

8.4.1 Nitrato

En la remoción del nitrato se observa diferencia estadística con la irradiancia ($p=0.00000$) y la interacción Irradiancia*Fase de crecimiento ($p=0.001027$, Fig. 35), pero no se encuentra diferencia significativa en cuanto a la combinación de factores Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento (Tabla 19). Las remociones obtenidas fueron de 80% en fase exponencial y 90% en fase estacionaria con ambas microalgas a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 19. Análisis de varianza de la remoción del nitrato con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	36052.52	1	36052.52	994.5007	0.000000
Microalga	55.88	1	55.88	1.5413	0.249587
Irradiancia	22597.61	1	22597.61	623.3500	0.000000
Fase de crecimiento	86.96	1	86.96	2.3987	0.160032
Microalga* Irradiancia	50.77	1	50.77	1.4004	0.270633
Microalga*Fase de crecimiento	45.90	1	45.90	1.2662	0.293112
Irradiancia*Fase de crecimiento	913.55	1	913.55	25.2001	0.001027
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	50.77	1	50.77	1.4004	0.270633
Error	290.02	8	36.25		

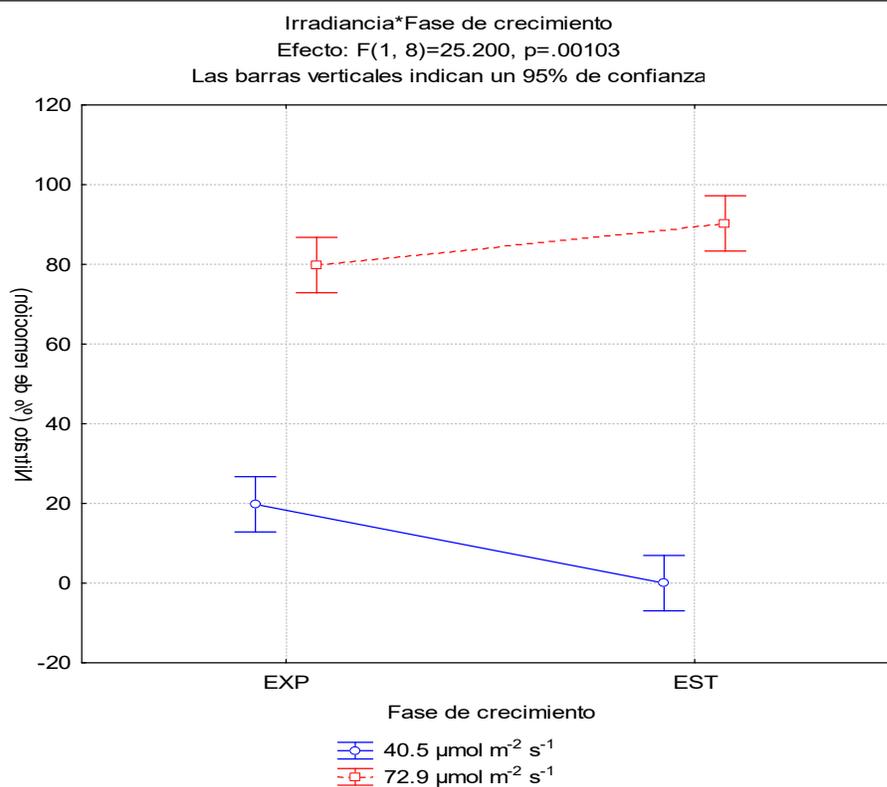


Fig. 35. Efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento sobre la remoción del nitrato en *C. vulgaris* y *N. oculata*.

8.4.2 Nitrito

Con el nitrito se encontró diferencia significativa en todas las interacciones excepto en la interacción Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 20). A 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa una remoción del 80% con *N. oculata* en fase exponencial y estacionaria, del 90% con *C. vulgaris* en fase estacionaria, mientras que a 72.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria, se alcanza 59% con *N. oculata* y 20% con *C. vulgaris* (Fig. 36).

Tabla 20. Análisis de varianza de la remoción del nitrito con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	28249.21	1	28249.21	1839.066	0.000000
Microalga	2795.77	1	2795.77	182.009	0.000001
Irradiancia	7704.45	1	7704.45	501.571	0.000000
Fase de crecimiento	7818.98	1	7818.98	509.028	0.000000
Microalga* Irradiancia	308.88	1	308.88	20.109	0.002044
Microalga*Fase de crecimiento	716.90	1	716.90	46.671	0.000133
Irradiancia *Fase de crecimiento	66.02	1	66.02	4.298	0.071883
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	3853.31	1	3853.31	250.856	0.000000
Error	122.89	8	15.36		

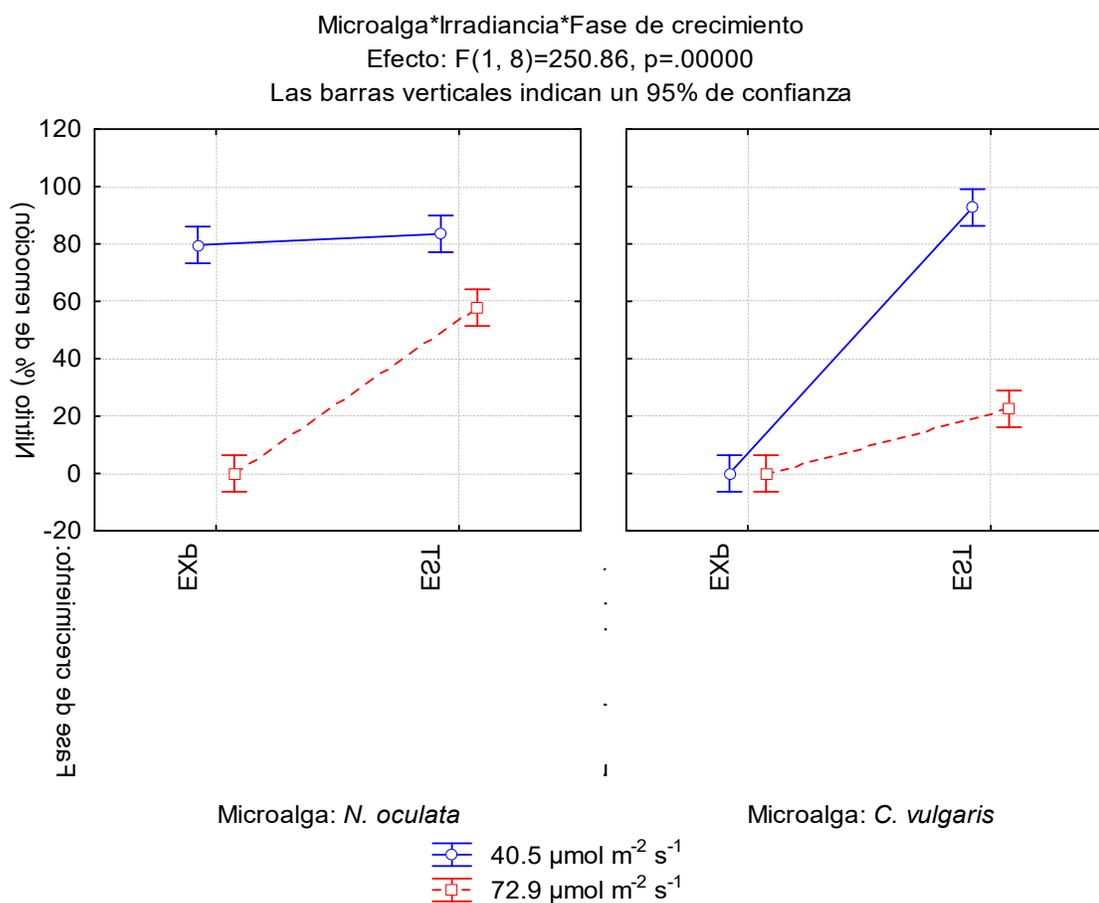


Fig. 36. Efecto de la combinación de factores Microalga *Irradiancia*Fase de crecimiento en la remoción del nitrito.

8.4.3 Amonio

En el análisis del amonio se muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la mayoría de los factores o combinación de estos a excepción de la microalga utilizada y la interacción Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 21). El porcentaje de remoción más alto (>90%) se obtuvo con ambas microalgas en fase estacionaria a 40.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 37).

Tabla 21. Análisis de varianza de la remoción del amonio, con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	44933.40	1	44933.40	616.4602	0.000000
Microalga	216.83	1	216.83	2.9747	0.122859
Irradiancia	1457.33	1	1457.33	19.9937	0.002079
Fase de crecimiento	584.43	1	584.43	8.0180	0.022095
Microalga* Irradiancia	1995.86	1	1995.86	27.3820	0.000790
Microalga*Fase de crecimiento	752.13	1	752.13	10.3188	0.012382
Irradiancia *Fase de crecimiento	10810.80	1	10810.80	148.3179	0.000002
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	51.48	1	51.48	0.7063	0.425083
Error	583.11	8	72.89		

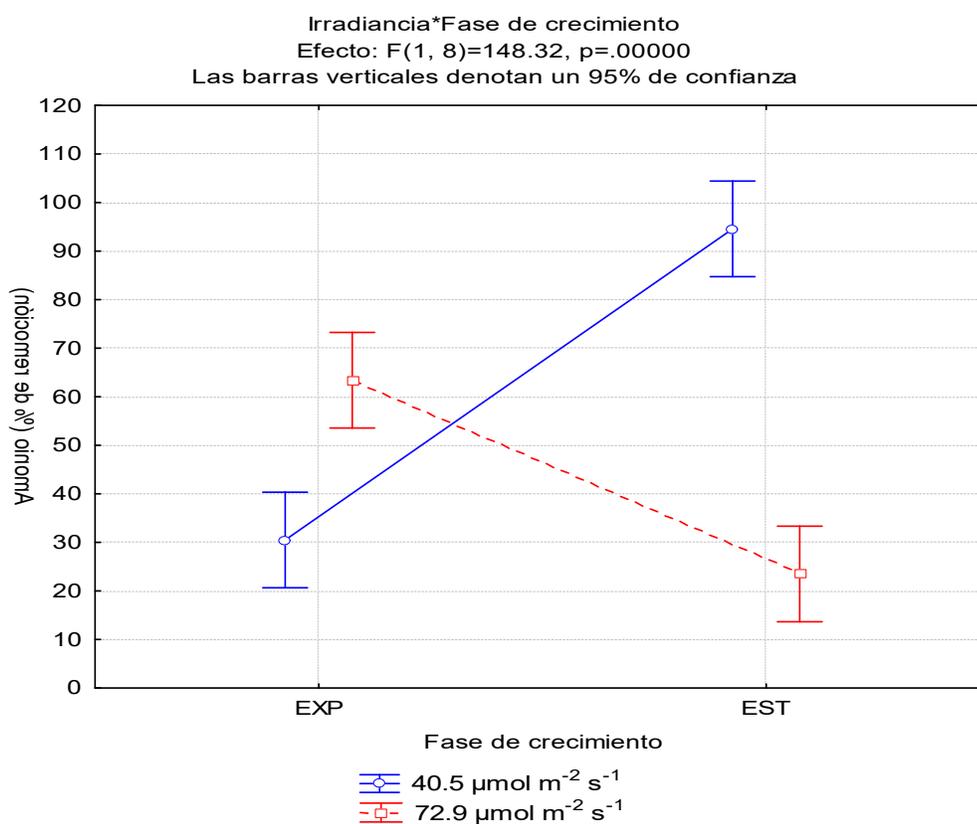


Fig. 37 Efecto de la combinación Fase de crecimiento*Irradiancia sobre la remoción del amonio con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

8.4.4 Fosfato

Se encontró diferencia significativa en cuanto a la Irradiancia utilizada, la fase de crecimiento y la combinación Irradiancia*Fase de crecimiento, mientras que no se encontró diferencia en cuanto al tipo de microalga utilizada, la interacción Microalga* Irradiancia, Microalga*Fase de crecimiento y la interacción Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento (Tabla 22). En la Fig. 38 se muestran los efectos principales, donde se observa que la remoción más alta (50%) a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria.

Tabla 22. Análisis de varianza de la remoción del fosfato, con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	7318.803	1	7318.803	379.0898	0.000000
Microalga	4.000	1	4.000	0.2072	0.661080
Irradiancia	4949.123	1	4949.123	256.3482	0.000000
Fase de crecimiento	897.003	1	897.003	46.4618	0.000136
Microalga* Irradiancia	13.690	1	13.690	0.7091	0.424200
Microalga*Fase de crecimiento	10.240	1	10.240	0.5304	0.487207
Irradiancia *Fase de crecimiento	217.563	1	217.563	11.2690	0.009977
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	2.250	1	2.250	0.1165	0.741609
Error	154.450	8	19.306		

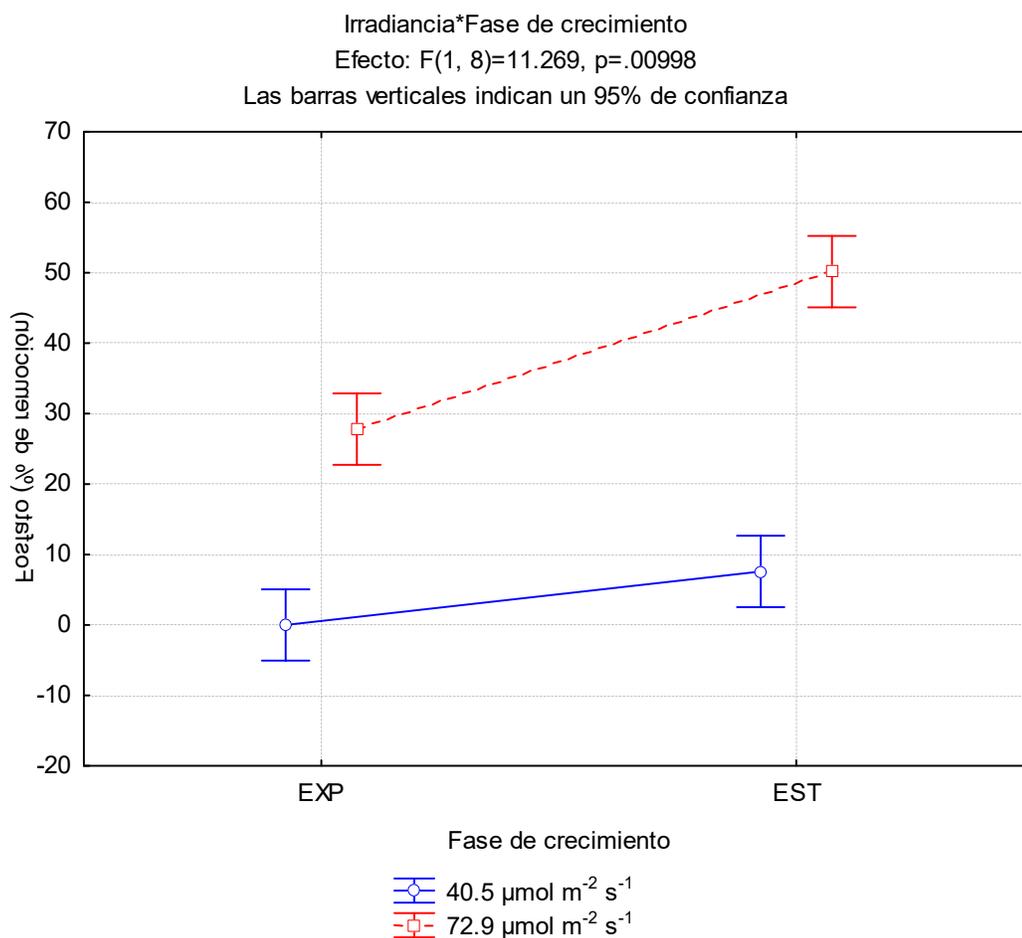


Fig. 38 Efecto de la combinación Fase de crecimiento*Irradiancia sobre la remoción del fosfato.

8.4.5 Demanda química de oxígeno (DQO)

En la remoción del DQO, se encontró diferencia significativa con la irradiancia ($p = 0.003354$), la combinación Microalga*Irradiancia ($p=0.026209$) y con la interacción Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento ($p = 0.041238$) (Tabla 23), las remociones más altas se obtuvieron a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 39). En la Tabla 24 se muestra el porcentaje de remoción de los parámetros medidos para cada microalga en las dos fases de crecimiento y las dos condiciones de irradiancia.

Tabla 23. Análisis de varianza de la remoción del DQO con *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	68356.10	1	68356.10	448.2772	0.000000
Microalga	4.41	1	4.41	0.0289	0.869184
Irradiancia	2585.72	1	2585.72	16.9571	0.003354
Fase de crecimiento	13.32	1	13.32	0.0874	0.775076
Microalga* Irradiancia	1128.96	1	1128.96	7.4037	0.026209
Microalga*Fase de crecimiento	110.25	1	110.25	0.7230	0.419875
Irradiancia *Fase de crecimiento	607.62	1	607.62	3.9848	0.080993
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	900.00	1	900.00	5.9022	0.041238
Error	1219.89	8	152.49		

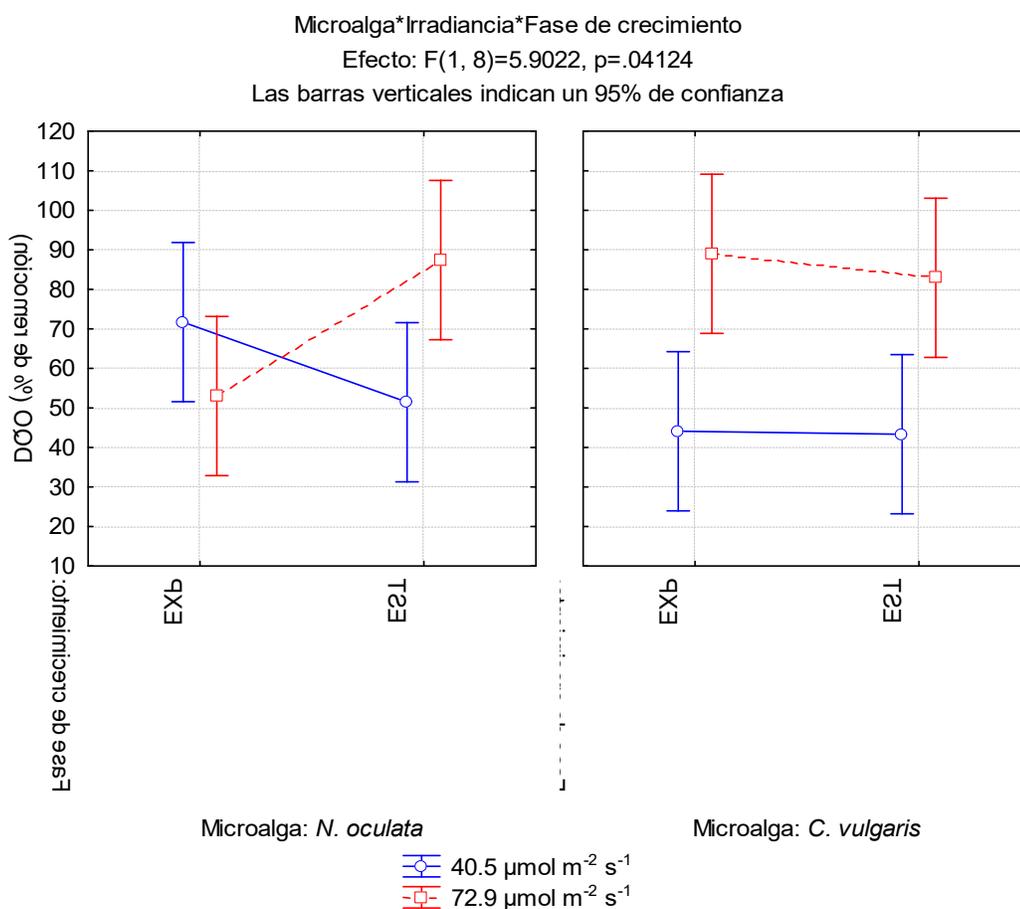


Fig. 39 Efecto de la irradiancia sobre la remoción del DQO.

Tabla 24. Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatados y materia orgánica.

Microalgas	Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fases de crecimiento	Nitrato (%)	Nitrito (%)	Amonio (%)	Fosfato (%)	DQO (%)
<i>C. vulgaris</i>	40.5	EXP	19.6 \pm 2.6	0 \pm 0	43.0 \pm 8.9	0 \pm 0	44.1 \pm 11.3
		EST	0 \pm 0	92.7 \pm 0.6	97.0 \pm 0.8	8.4 \pm 1.1	43.3 \pm 8.0
	72.9	EXP	79.7 \pm 11.7	0 \pm 0	57.2 \pm 10.2	25.2 \pm 1.5	89.0 \pm 3.8
		EST	83.2 \pm 9.8	22.5 \pm 3.5	0 \pm 0	49.9 \pm 5.2	82.9 \pm 5.1
<i>N. oculata</i>	40.5	EXP	19.9 \pm 3.0	79.6 \pm 9.3	17.9 \pm 0.1	0 \pm 0	71.7 \pm 6.9
		EST	0 \pm 0	79.2 \pm 11.3	92.1 \pm 1.1	8.0 \pm 3.2	51.4 \pm 12.7
	72.9	EXP	80.0 \pm 5.4	0 \pm 0	69.6 \pm 3.6	30.4 \pm 4.1	53.0 \pm 6.7
		EST	97.4 \pm 3.7	57.5 \pm 3.1	47.0 \pm 10.4	50.4 \pm 8.9	87.4 \pm 4.8

8.5 Composición bioquímica de las microalgas *C. vulgaris* y *N. oculata*.

8.5.1 Lípidos

En la producción de lípidos solo se encontró diferencia significativa en el tipo de microalga utilizada ($p=0.027786$), siendo la que mayor produjo *N. oculata* (Fig. 40), pero no se detectó diferencia con la irradiancia, la fase de crecimiento y las interacciones Microalga*Irradiancia, Microalga*Fase de crecimiento, Irradiancia*Fase de crecimiento y Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 24).

Tabla 25. Análisis de varianza sobre la producción de lípidos de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	15785.01	1	15785.01	1172.553	0.000000
Microalga	78.84	1	78.84	5.857	0.027786
Irradiancia	30.60	1	30.60	2.273	0.151128
Fase de crecimiento	10.53	1	10.53	0.782	0.389485
Microalga* Irradiancia	0.09	1	0.09	0.007	0.934528
Microalga*Fase de crecimiento	0.12	1	0.12	0.009	0.925825
Irradiancia *Fase de crecimiento	3.45	1	3.45	0.256	0.619574
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	46.20	1	46.20	3.432	0.082477
Error	215.39	16	13.46		

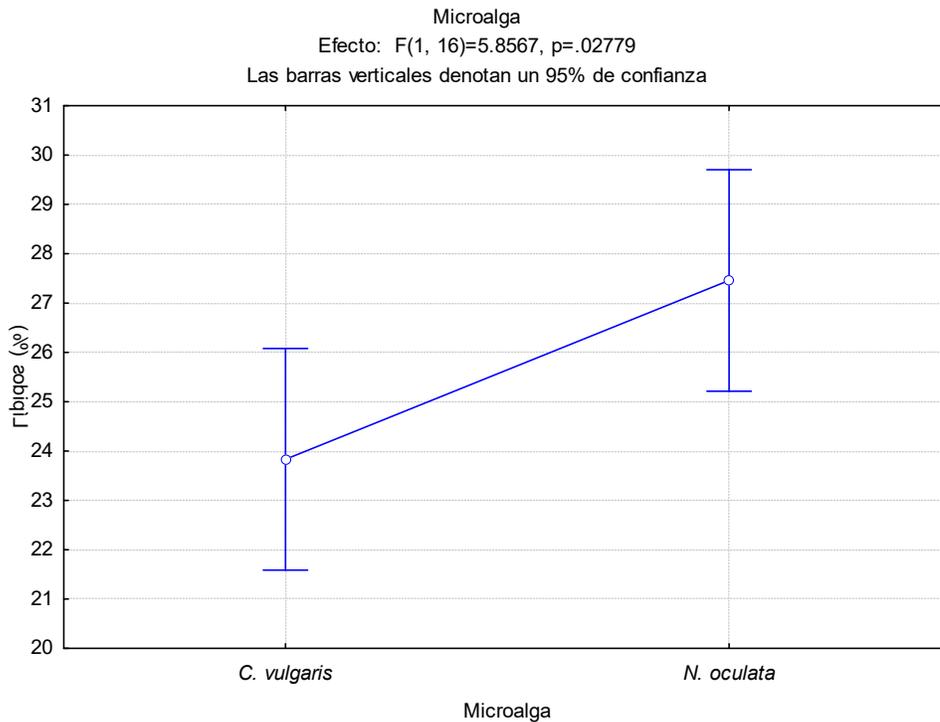


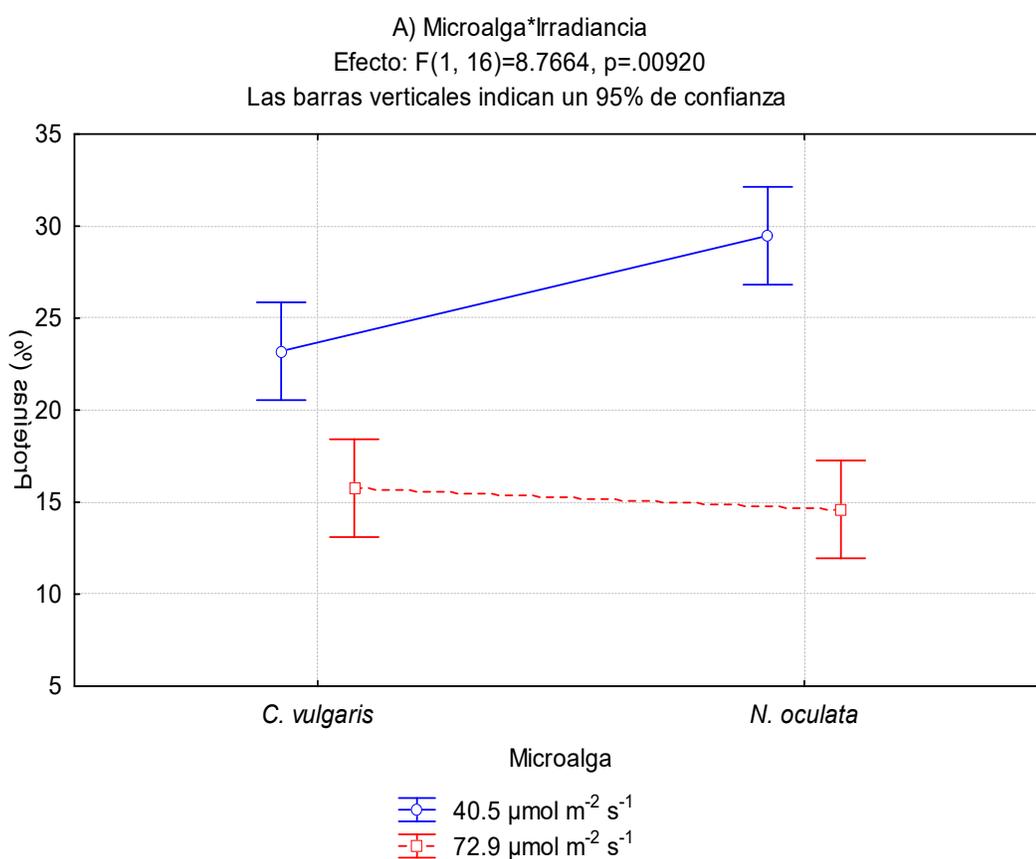
Fig. 40 Efecto del tipo de microalgas en la producción de lípidos.

8.5.2 Proteína

En la producción de proteínas, se encontró diferencia significativa con la irradiancia, la fase de crecimiento y las combinaciones Microalga*Irradiancia y Microalga*Fase de crecimiento, pero no se encontró diferencia con la interacción Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 26). En la Fig. 41a se observa que la mayor producción de proteínas se obtuvo a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con ambas microalgas, y en la Fig 41b se observa que la mayor producción se obtuvo en la fase de crecimiento exponencial.

Tabla 26. Análisis de varianza sobre la producción de proteínas de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	10346.37	1	10346.37	1096.788	0.000000
Microalga	39.30	1	39.30	4.166	0.058105
Irradiancia	746.72	1	746.72	79.157	0.000000
Fase de crecimiento	309.53	1	309.53	32.812	0.000031
Microalga* Irradiancia	82.70	1	82.70	8.766	0.009201
Microalga*Fase de crecimiento	79.39	1	79.39	8.416	0.010420
Irradiancia *Fase de crecimiento	0.86	1	0.86	0.091	0.766247
Microalga* Irradiancia *Fase de crecimiento	25.90	1	25.90	2.745	0.117025
Error	150.93	16	9.43		



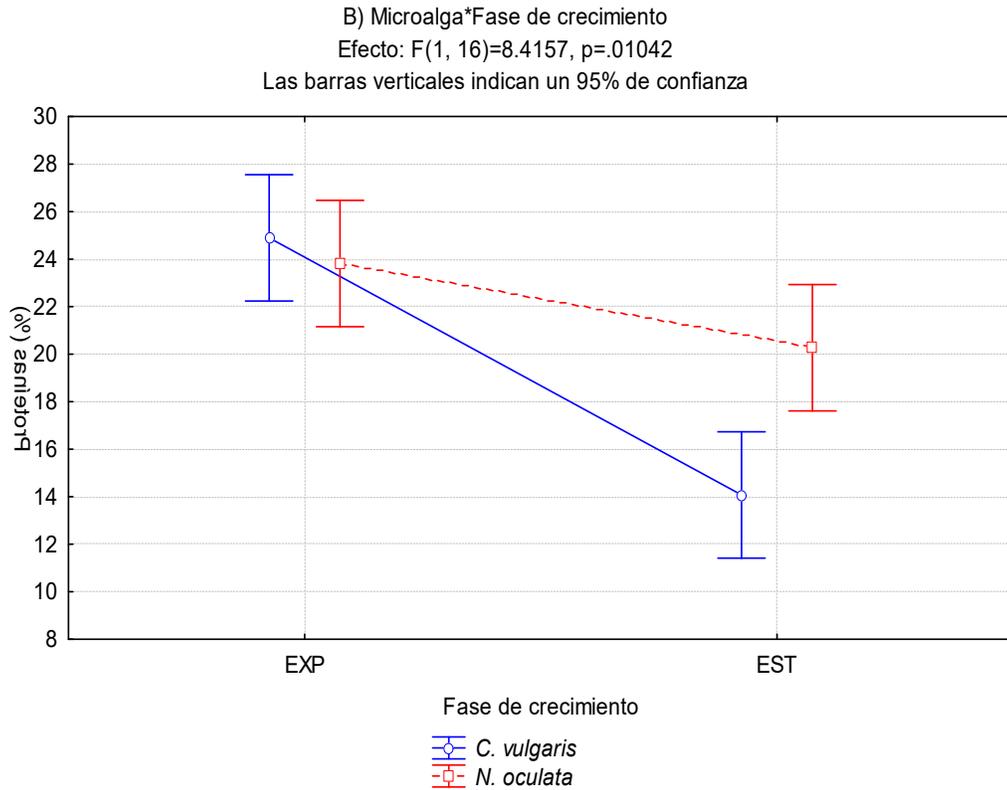


Fig. 41 Efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento sobre la producción de proteínas de *C. vulgaris* y *N. oculata*. A) Efecto de la Microalga e irradiancia, B) Efecto de la Microalga y fase de crecimiento.

8.5.3 Carbohidratos

El análisis de varianza encontró diferencia significativa en la fase de crecimiento, en las interacciones Irradiancia*Fase de crecimiento y Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento (Tabla 27). En la Fig. 42 se puede observar que el mayor porcentaje de carbohidratos se obtuvo a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la fase de crecimiento exponencial con *C. vulgaris*. En la Tabla 28 se muestra el porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos obtenidos de cada microalga en cada fase de crecimiento e irradiancia.

Tabla 27. Análisis de varianza sobre la producción de carbohidratos de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	17023.23	1	17023.23	662.6211	0.000000
Microalga	81.27	1	81.27	3.1635	0.094306
Irradiancia	25.84	1	25.84	1.0060	0.330798
Fase de crecimiento	496.40	1	496.40	19.3220	0.000451
Microalga* Irradiancia	24.33	1	24.33	0.9471	0.344948
Microalga*Fase de crecimiento	38.73	1	38.73	1.5076	0.237257
Irradiancia *Fase de crecimiento	248.77	1	248.77	9.6833	0.006712
Microalga*Irradiancia *Fase de crecimiento	134.47	1	134.47	5.2342	0.036098
Error	411.05	16	25.69		

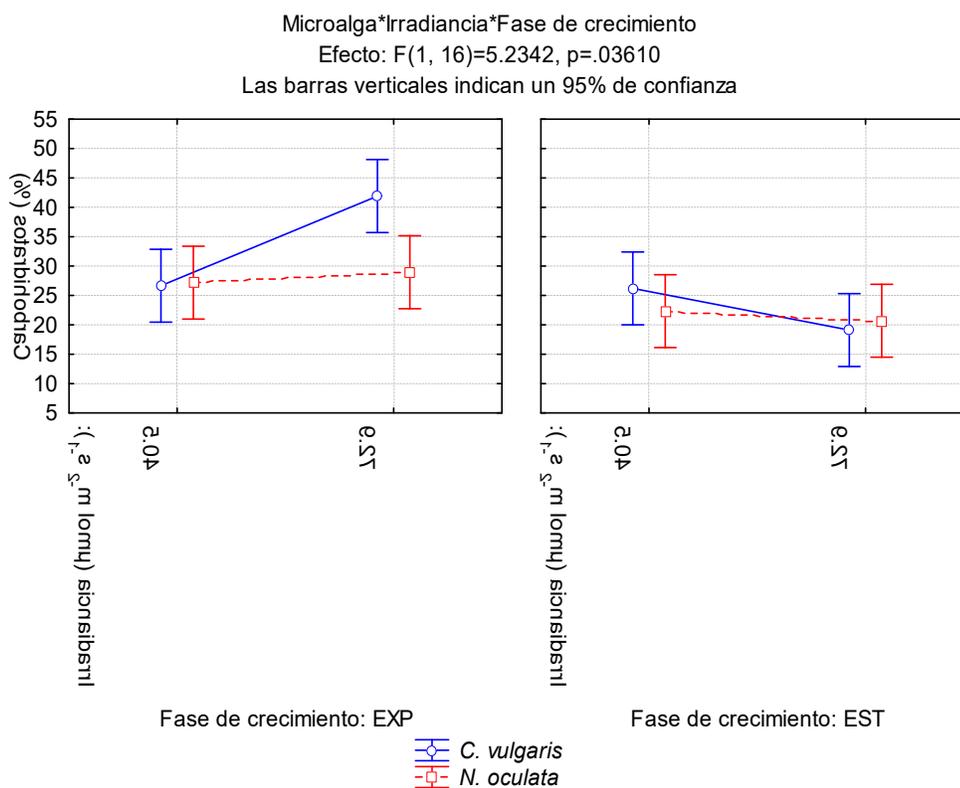


Fig. 42 Efecto de la Microalga*Irradiancia*Fase de crecimiento sobre la producción de carbohidratos.

Tabla 28. Porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos en *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Microalga	Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fase de crecimiento	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
<i>C. vulgaris</i>	40.5	EXP	25.5 \pm 0.9	29.8 \pm 1.1	26.7 \pm 3.7
		EST	21.8 \pm 2.6	16.6 \pm 0.6	26.2 \pm 4.2
	72.9	EXP	22.3 \pm 2.2	19.9 \pm 1.7	41.9 \pm 1.5
		EST	27.2 \pm 1.7	11.6 \pm 0.9	19.1 \pm 4.6
<i>N. oculata</i>	40.5	EXP	26.0 \pm 1.7	30.4 \pm 4.9	27.2 \pm 3.5
		EST	28.3 \pm 0.9	28.6 \pm 5.9	22.3 \pm 3.3
	72.9	EXP	28.5 \pm 2.9	17.2 \pm 3.2	29.0 \pm 3.2
		EST	27.6 \pm 1.6	12.0 \pm 0.9	20.7 \pm 3.1

8.6 Producción de CH₄ durante la digestión anaerobia en condición mesofílica.

La cinética de producción de biometano con un consorcio bacteriano de purín de cerdo y biomasa de *C. vulgaris* y *N. oculata* se muestra en la Fig. 43. El tiempo en que se empezó a producir el biometano varió entre los 15 y 20 días, dependiendo del sustrato. Con biomasa de *C. vulgaris* EST la producción inició en el día 15, con biomasa *C. vulgaris* EXP el biometano se empezó a producir hasta el día 20. Con biomasa de *N. oculata* (EXP y EST) como sustrato, la producción de biometano inició en el día 18. El rendimiento de biometano más alto se tiene con el sustrato *C. vulgaris* EXP, alcanzando los 2617.20 ±386.02 mL CH₄ g SV⁻¹ (Tabla 29). El mejor rendimiento de metano diario se obtuvo entre los días 15 y 33 (Fig. 44).

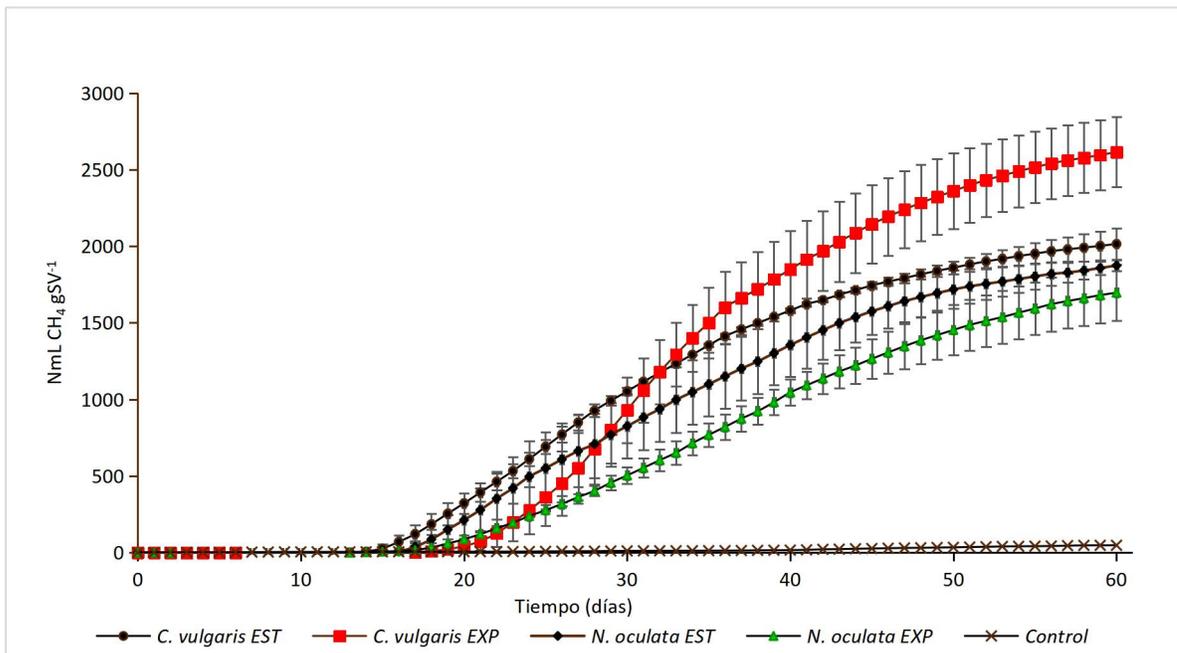


Fig. 43 Producción de biometano con *C. vulgaris* y *N. oculata* como sustrato.

Tabla 29. Producción de biometano con dos tipos de sustratos (Microalgas).

Sustrato	<i>C. vulgaris</i> EST	<i>C. vulgaris</i> EXP	<i>N. oculata</i> EST	<i>N. oculata</i> EXP
Biometano (NmL CH ₄ g SV ⁻¹)	2014.74 ±102	2613.95 ±229	1873.67 ±37	1696.72 ±182

EXP: Cosecha en fase exponencial; EST: Cosecha en fase estacionaria

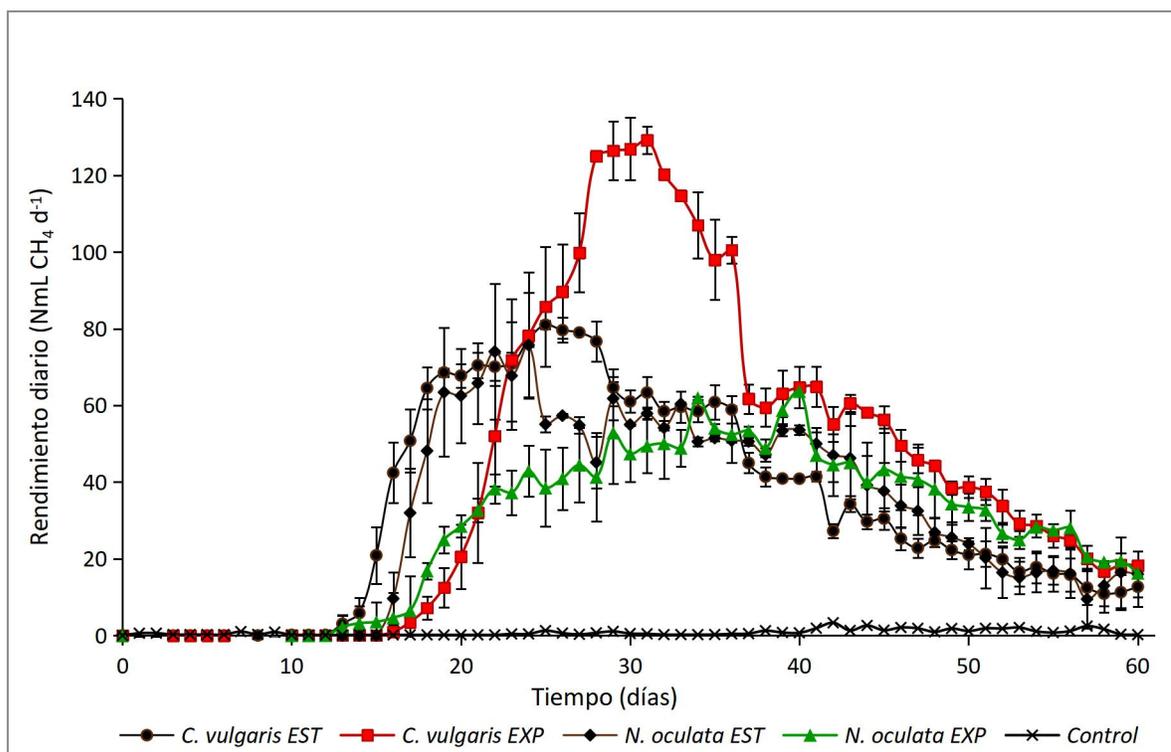


Fig. 44 Rendimiento diario de metano.

8.6.1 Ajuste al Modelo de Gompertz modificado

La producción de biometano se ajustó al Modelo de Gompertz modificado, obteniendo una $R^2 > 0.9986$ (Tabla 30, Fig. 45).

Tabla 30. Constantes de Gompertz modificado.

Sustrato	a	b	c	R ²
<i>C. vulgaris</i> EST G	2042.45	76.42	16.31	0.9998
<i>C. vulgaris</i> EXP G	2647.04	112.89	22.03	0.9999
<i>N. oculata</i> EST G	1975.43	65.45	17.53	0.9999
<i>N. oculata</i> EXP G	1930.24	55.50	21.10	0.9986

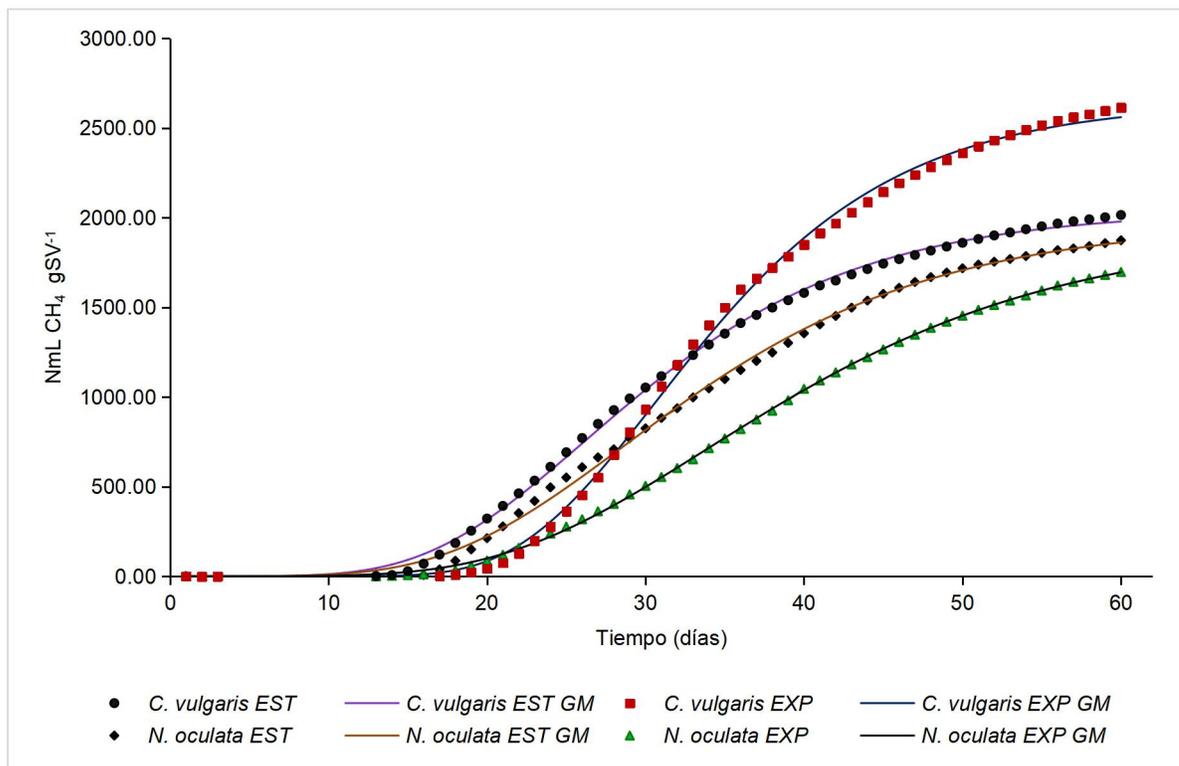


Fig. 45 Ajuste de la producción de biometano al Modelo de Gompertz modificado.

El análisis de varianza demostró diferencia significativa ($p=0.03019$) con el tipo de sustrato utilizado (*C. vulgaris* y *N. oculata*), encontrando mayor producción con el sustrato: biomasa de *C. vulgaris* (Fig. 46), pero no encontró diferencia con la fase de crecimiento y la combinación Microalga*Fase de crecimiento (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis de varianza de la producción de biometano.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	33643428	1	33643428	667.6824	0.000013
Microalga	545732	1	545732	10.8305	0.030188
Fase de crecimiento	87116	1	87116	1.7289	0.258868
Microalga*Fase de crecimiento	300566	1	300566	5.9650	0.071030
Error	201553	4	50388		

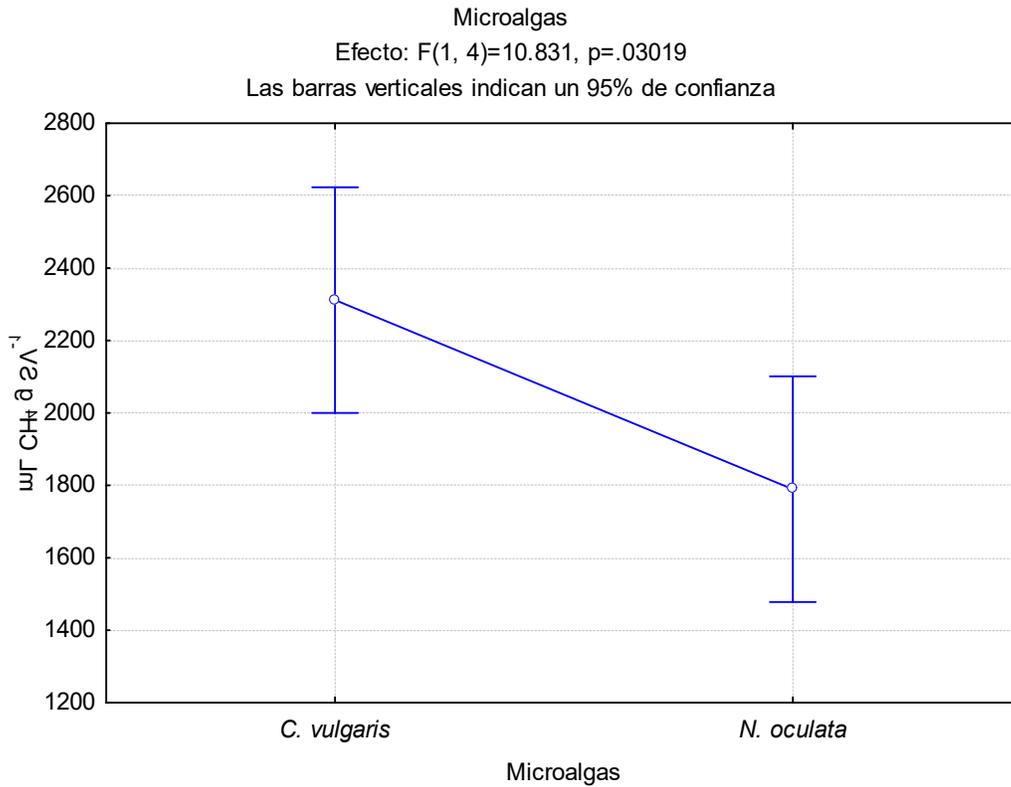


Fig. 46 Efecto del tipo de microalga en la producción de biometano.

8.6.2 Potencial bioquímico de metano teórico

Los resultados obtenidos de la conversión del perfil bioquímico (proteínas, carbohidratos y lípidos) a biometano se muestran en la Tabla 32, la biodegradabilidad alcanzada fue de 98.88% con el sustrato de la microalga *C. vulgaris* en fase exponencial (Tabla 33).

Tabla 32. Potencial bioquímico de metano teórico del perfil bioquímico de *C. vulgaris* y *N. oculata*.

Metano teórico	<i>C. vulgaris</i> EXP	<i>C. vulgaris</i> EST	<i>N. oculata</i> EXP	<i>N. oculata</i> EST
Carbohidratos (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	590.03	481.72	540.35	553.49
Lípidos (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	1590.33	1298.39	1456.41	1491.83
Proteínas (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	463.11	378.09	424.11	434.43
Total (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	2643.47	2158.20	2420.88	2479.75

Tabla 33. Biodegradabilidad de los sustratos utilizados.

Metano	<i>C. vulgaris</i> EXP	<i>C. vulgaris</i> EST	<i>N. oculata</i> EXP	<i>N. oculata</i> EST
Teórico (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	2643.47	2158.20	2420.88	2479.75
Medido (mL CH ₄ gSV ⁻¹)	2613.95	2014.74	1696.72	1873.67
Biodegradabilidad (%)	98.88	93.35	70.08	75.56

8.6.3 Balance energético

La energía total producida fue de 0.4037 kw, mientras que la energía utilizada fue de 30.096 kw, por lo tanto, se alcanzó a cubrir el 1.34% de la energía suministrada. En cuanto al balance diario, se encontró que con la producción diaria obtenida se alcanza a cubrir del 5 al 5.77% de la energía consumida entre los días 27 al 33.

9. DISCUSIONES

9.1 Efluente residual

Respecto a las variaciones que se producen en la esterilización de los efluentes, Chacón *et al.* (2004) menciona que el contenido de fosfatos ($P-PO_4^{-3}$), nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$) y DQO varían si los análisis se realizan al efluente crudo, filtrado o esterilizado, siendo los más altos en el efluente crudo, en cuanto al fosfato encontró una disminución del 11.7 % (filtrado) y del 30 % (esterilizado), con el amonio del 13.95 % (filtrado) y del 69.77 % (esterilizado), con el DQO del 61.16 % (filtrado) y del 42.25 % (esterilizado). Una de las características que hizo elegible al efluente ETE2 fue que conservó mayor concentración de contaminantes, por lo que fue el efluente utilizado en los ensayos.

9.2 Cinética de crecimiento y densidad celular.

En la presente investigación, las fases de crecimiento exponencial y estacionaria se encontraron con *C. vulgaris* y *N. oculata* a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los días 6-10 y 12-16 (Fig. 27a), respectivamente, a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo la fase exponencial entre los días 5-11 y la fase estacionaria entre los 12-14, observando que las fases de crecimiento con MBB son muy similares, a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se observa diferencia en cuanto al crecimiento, lo que si se muestra a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con una mayor densidad celular tanto en el control como en el efluente, habiendo en este último (efluente) menor crecimiento (Fig. 27b), donde los factores utilizados (microalga, irradiancia, fase de crecimiento y medio de cultivo) intervinieron directamente en la densidad celular alcanzada a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 27, Tabla 14). La densidad celular alcanzada a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con *C. vulgaris* fue de $1.38 \times 10^7 \pm 4.88 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (EXP) y $4.62 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ (EST) y con *N. oculata* de $2.39 \times 10^7 \pm 3.46 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (EXP) y $4.45 \times 10^7 \pm 2.33 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por Richmond (2004), quién menciona que el factor más importante sobre el

crecimiento celular es la irradiancia, así como una densidad celular adecuada puesto que a densidades bajas se tienen rendimientos menores que a densidades de siembra altas, aunado a ello se deben considerar los nutrientes y el fotoperíodo, esto explica la diferencia en los tiempos en los que se alcanza la fase exponencial y estacionaria así como la concentración celular más alta en este y en diferentes estudios: Chacón *et al.* (2004) utilizando *Chlorella spp.*, en agua residual urbana, encontró las fases de crecimiento entre los días 11-14 (EXP) y 20-23 (EST) con una densidad celular de $6.62 \times 10^7 \pm 4.61 \times 10^6$ cel mL⁻¹ en fase estacionaria a $137 \mu\text{mol} \cdot \text{q} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bajo ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas, utilizando una densidad celular de siembra de 0.64×10^6 cel mL⁻¹. En estudios más recientes se tiene a Ferrer-Álvarez *et al.* (2015) con *C. vulgaris* y *N. oculata*, quienes encontraron las fases de crecimiento en los días 3-5 (EXP) y 6-7 (EST) a $79.88 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con lámparas Multi-LEDs y luz blanca en efluente de tilapia, la densidad celular en la fase de crecimiento exponencial varía entre $4.75\text{-}5.63 \times 10^7$ cel mL⁻¹ con iluminación Multi-LEDs y $3.43\text{-}4.52 \times 10^7$ con Luz blanca, densidades celulares menores que Chacón *et al.* (2004) pero más altas a las encontradas en este estudio en la misma fase de crecimiento. Por otro lado, El-Sheekh *et al.* (2016) con *N. oculata* reporta fases de crecimiento en medio F/2 entre los días 4-10 (EXP) y 10-12 (EST), con densidades celulares menores a las mencionadas con una irradiancia de $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Con medio establecido Conway a $350 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con *Chlorella sp* y *N. oculata* las fases de crecimiento se han encontrado en los días 4-7 (EXP) y 10-12 (EST) con ambas microalgas (Paes *et al.* 2016). Álvarez-Meza (2017) reporta las cinéticas de crecimiento con *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* más cortas, una fase exponencial del día 1 al 3 y la fase estacionaria en los días 3-4. Kumaran *et al.* (2023) con *C. vulgaris* y efluentes de molinos de palma, reporta las fases de crecimiento entre los días 4-7 (EXP) y 9-11 (EST) con una intensidad de luz de $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sin reportar densidad de siembra y densidad celular alcanzada. Contrario a los autores que reportan claramente las fases de crecimiento, Martínez-Macias *et al.* (2019) y Aguilar-Ruiz *et al.* (2020) encontraron con *Nannochloropsis oculata* expuesta a diferentes

concentraciones de cobre una fase de adaptación larga, en algunos casos alcanzó los 10 días y después creció de forma exponencial sin observarse una fase estacionaria hasta el día 21, término del cultivo. De los autores mencionados, Chacón *et al.* (2004) tuvo el ciclo de cultivo más largo de 27 días, los demás autores terminan antes de los 21 días, y en este estudio se llevó hasta los 16 días. En algunos casos se puede encontrar una característica común como la temperatura, la intensidad de luz o la densidad de siembra, pero el cambio de estos factores nos da como resultado un rendimiento celular más alto o bajo, sin embargo obtenemos un patrón de crecimiento, lo que podemos constatar con los resultados obtenidos en esta investigación, variando la intensidad de luz y manteniendo constantes los demás factores, obteniendo mejor rendimiento celular a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

9.3 Producción y productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloris oculata*

Para efecto en la producción y productividad de biomasa se encontró que esta se ve influenciada por la irradiancia y la fase de crecimiento (Tabla 16), obteniendo una producción mayor con $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 29), específicamente en la fase estacionaria con ambas microalgas. Los factores que influyeron en la producción de biomasa (irradiancia y fase de crecimiento) también afectaron a la productividad (Tabla 17, Fig. 30). Los valores de producción obtenidos en fase estacionaria a $72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ son ligeramente más altos (0.684 g L^{-1} y 0.718 g L^{-1} , *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente, a los obtenidos por Ferrer-Álvarez *et al.* (2015), quienes alcanzaron con *C. vulgaris* un rendimiento de 0.598 mg L^{-1} en MBB y 0.319 mg L^{-1} en efluente y con *N. oculata* de 0.400 g L^{-1} en MBB y 0.224 mg L^{-1} en efluente de tilapia. Kumaran *et al.* (2023) reportan con *C. vulgaris* y efluentes de molinos de aceite de palma en fase exponencial (día 7) una producción de 0.42 g L^{-1} , sin embargo, con el control (medio BG-11) reportan una producción de 0.34 g L^{-1} encontrando una producción mayor en el efluente, aunado a esto utilizaron una

intensidad de luz de $400 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. López-Sánchez *et al.* (2022a) realizaron una recopilación de los estudios realizados en cuanto a producción con diferentes efluentes y encontraron con *C. vulgaris* una producción de $0.49\text{-}3.96 \text{ g L}^{-1}$ en aguas residuales porcinas y mayor a 1 g L^{-1} en aguas residuales de aves de corral y de ganado. Con *Nannochloropsis oculata* una producción de $2.36\text{-}3.22 \text{ g L}^{-1}$, en aguas residuales de digestatos de cerdo. Estos rendimientos son superiores a los encontrados en el presente estudio. Sin embargo, no se menciona la irradiancia utilizada ni la densidad celular de siembra, factores que pueden influir en el crecimiento de las microalgas y por lo tanto en la cantidad de biomasa producida. Respecto a los valores de productividad encontrados en este estudio con *C. vulgaris* son más bajos a los reportados por Ferrer-Álvarez *et al.* (2015) en fase exponencial, y están dentro de los valores encontrados en fase estacionaria, los valores de productividad más altos son reportados por Kumaran *et al.* (2023) siendo de $0.060 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con efluente y de $0.045 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con medio BG-11, quienes utilizaron una irradiancia de $400 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación de $72.9 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, no se menciona la densidad de siembra. Con *N. oculata* se obtuvieron productividades más altas a las reportadas por Ferrer-Álvarez *et al.* (2015) quienes reportan $0.0219 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (EXP) y $0.0320 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (EST) a los alcanzados en este estudio de $0.042 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (EXP) y $0.048 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (EST) a $72.9 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por el contrario, otros autores han logrado obtener productividades superiores a $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Martínez-Macias *et al.* 2019) y $0.197 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Aguilar-Ruiz *et al.* 2020) en efluentes ácidos de las minas, agregando que la densidad de siembra utilizada con Martínez-Macias *et al.* (2019) fue de $6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. Es importante resaltar que el tiempo en el que se alcanzan las fases de crecimiento tienen influencia en la productividad, puesto que entre más corto el tiempo más productividad se obtiene en el cultivo.

9.4 Remoción de compuestos nitrogenados, fosfatos y materia orgánica.

Lo obtenido en este estudio concuerda con lo reportado con otros autores que mencionan que una mayor intensidad de luz demanda una mayor asimilación de nutrientes, Rendón-Castrillón *et al.* (2015) menciona que la asimilación del nitrógeno inorgánico es fuertemente dependiente de la luz, tanto la intensidad de luz como su calidad ya que pueden controlar la asimilación de NO_3^- a través de la regulación de la síntesis y actividad de la enzima nitrato reductasa (NR). Los resultados obtenidos por Garatachia-Vargas (2018), demuestran que el tipo de reactor utilizado también tiene influencia en la remoción de compuestos nitrogenados y fosfatados, ya que encontró mayor remoción en fotobiorreactores planos que en los fotobiorreactores tubulares utilizando la misma irradiancia ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En este estudio se observó que el amonio y el nitrito fueron los compuestos mayormente asimilados a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 31b y Fig. 31c), esto puede explicarse por el orden que la microalga utiliza los compuestos nitrogenados, donde primero se absorbe amonio, después nitritos, y por último nitrato (Oscanoa-Huaynate *et al.* 2021, Medina-Aguilar 2016). Sin embargo, hay casos en que nitrato, nitrito y amonio son asimilados simultáneamente (Oscanoa-Huaynate *et al.* 2021). La disminución del amonio se ha convertido en una característica común en los estudios donde se muestra el comportamiento dinámico (Ferrer-Álvarez *et al.* 2015, Paes *et al.* 2016, Garatachia-Vargas 2018), esto se debe a que las algas consumen preferentemente NH_4^+ en lugar de NO_3^- (Kube *et al.* 2018, Lin *et al.* 2016), debido a que se requieren pocos pasos bioquímicos y un requerimiento energético bajo para su asimilación (Lin *et al.* 2016), pero cuando ambas formas están presentes (nitrato y nitrito), el consumo de NO_3^- es mínimo hasta que se elimina la mayor parte del NH_4^+ (Kube *et al.* 2018). La baja remoción del nitrito a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se explica porque entre más alta la irradiancia más nitrato es absorbido lo que provoca la formación de nitrito y el cual es liberado por sus efectos citotóxicos (Medina-Aguilar 2016). Efectos similares han sido observados con algunas diatomeas y flagelados con suficiente nitrógeno

como respuesta a los rápidos aumentos de la irradiancia. Este comportamiento resulta de la reducción de nitrato a nitrito por la actividad de la nitrato reductasa, no seguida por una mayor reducción a amoníaco por la nitrito reductasa (Paes *et al.* 2016). En el caso del fosfato, se observó un incremento en los primeros días a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Ruiz-Martínez *et al.* (2015) observaron en *Scenedesmus sp.*, que el contenido inicial de P (fosforo) en la célula afecta el consumo de P, ya que a mayor contenido de P en la biomasa interna, menor tasa de remoción de fosfato, misma observación obtenida por Kube *et al.* (2018), quién sugiere aumentar la concentración de P en el cultivo para incrementar la tasa de eliminación y que fue probado con *Scenedesmus*. Yao *et al.* (2011) observaron con *S. quadricauda* que el PO_4^{3-} primero se adsorbía en la superficie celular a un ritmo rápido y luego la célula lo consumía lentamente, por lo que menciona que en las algas hay una coexistencia de depósitos de fósforo intracelular y adsorbido, lo que indica que la absorción de fosfato por el fitoplancton es un proceso cinético de dos etapas, y en el caso del P adsorbido en la superficie, este está en equilibrio con las aguas residuales circundantes y podría liberarse después de un largo tiempo de retención afectando el consumo interno. En este contexto, Kube *et al.* (2018) menciona que para aumentar el consumo de P se debe aumentar la concentración de nitrógeno, ya que la limitación de este puede disminuir la membrana tilacoide, que gobierna la fotosíntesis (Beuckels *et al.* 2015). Por otro lado, Grobbelaar (2004) menciona que cuando el fósforo limita el crecimiento hay una excreción de fosfatasas alcalinas que movilizan el P orgánico adsorbido y lo pone a disposición de las algas, lo que puede explicar el incremento de fósforo en el medio de cultivo. Otros factores que pueden influir en la captación de fosfatos por parte de las algas son: ausencia de potasio, magnesio o sodio y un pH alto o bajo (Palacios-Sánchez 2022). Con el objetivo de aumentar las tasas de eliminación de fósforo se ha planteado el concepto de mantener en inanición las células algales antes de exponerlas a las aguas residuales, sin embargo, Kube *et al.* (2018) menciona que esto no funciona para todas las especies y en particular no es adecuado para *C. vulgaris* pero si para *Chlorella sorokiniana*.

Respecto a la DQO, Chacón *et al.* (2004) no pudo establecer una relación entre la remoción de la DQO y el crecimiento de las microalgas, obteniendo una remoción del 54.8 % y lo asocia con la utilización de volúmenes menores de cultivo, en los cuales las elevadas densidades celulares alcanzadas introducen también la producción de exoproductos orgánicos, los cuales no permiten diferenciar entre la materia orgánica existente en el agua residual y la generada como producto del metabolismo microalgal. Iriarte *et al.* (2007) menciona que las algas liberan exudados y materia orgánica particulada, Richmond (2004) agrega que los exudados inhiben el crecimiento de algas, especialmente como medio para limitar la competencia entre especies y como defensa contra la depredación, se ha sugerido que la producción de autoinhibidores tiene lugar en cultivos masivos de algas de ultra alta densidad. El porcentaje de remoción alcanzados en este estudio son mayores a los reportados por Ferrer-Álvarez *et al.* (2015), a excepción del fosfato, al mismo tiempo se coincide con una remoción de 0 % en fase exponencial en el caso del nitrito. Paes *et al.* (2016) utilizando una intensidad de luz de $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, reporta un consumo de fosfato del 92.7 % en medio establecido Conway, y de aproximadamente el 34 % cuando hay limitación de nitrógeno, lo que soporta la afirmación de Kube *et al.* (2018) que para aumentar la eliminación de fósforo hay que aumentar la concentración de nitrógeno. Haritz y Takriff (2017) reporta remociones de 89.5, 99.7, 92 y 75.5 % con nitrato, amonio, fosfato y DQO. Por otra parte, Gil-Izquierdo *et al.* (2020) reportan una disminución de 89.90 y 99.70 % de nitratos y fosfatos, respectivamente, utilizando un consorcio de microalgas (*Monoraphidium sp.*, *Desmodesmus subspicatus*, *Nannochloris sp.*) en aguas residuales urbanas, destacando que fue con luz y temperatura del medio ambiente. Con efluentes del pez laukaa, Calderini *et al.* (2021) reportan remociones de $\text{PO}_4\text{-P}$ del 99 % con *M. griffithii* y *Selenastrum sp*, menos del 75 % por *H. pluvialis*. En la remoción de $\text{NO}_3\text{-N}$: menos del 40% en las 3 especies utilizadas (*Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium griffithii* y *Selenastrum sp*). López-Sánchez *et al.* (2022b) realizaron el tratamiento de aguas del sector ganadero (porcino, bovino y avícola), con tres microalgas *Chlorella vulgaris*,

Haematococcus pluvialis y *Chlamydomonas reinhardtii*. El mejor resultado fue con *C. vulgaris* como monocultivo en una mezcla de digestato de 0.125:0.4375:0.4375 (ADSW:ADPW:ADCW) alcanzando una remoción total de nitrógeno de 85.00 ± 1.58 %, una remoción total de fósforo de 65.69 ± 3.05 % y una remoción de demanda química de oxígeno de 43.95 ± 7.92 %. López-Sánchez *et al.* (2022a) menciona que *Chlorella vulgaris* alcanza remociones de 25-99 % de DQO (demanda química de oxígeno), 50-98 % de nitrógeno total, 41-95 % de fósforo total en aguas residuales porcinas; 45-82 % de DQO, 89 % de fósforo total en aguas residuales de aves de corral; 62-92 % de DQO, 81-94 % de nitrógeno total, 85-94 % de fósforo total en aguas residuales del ganado. Con *Nannochloropsis oculata* reporta remociones del 64-86 % de nitrógeno total, 99 % de fósforo total en aguas residuales de digestatos de cerdo. Argumentando que no se mencionan densidades de siembra e irradiancia.

9.5 Análisis bioquímico

Respecto a la producción de biomoléculas (lípidos, proteínas y carbohidratos), éstas se produjeron en mayor o menor medida dependiendo de la especie de microalga y la irradiancia. Los lípidos obtenidos con *N. oculata* variaron de 26 a 28.5% con *N. oculata* y de 21.8 a 27.3% con *C. vulgaris*, el análisis estadístico no detectó diferencia entre las fases de crecimiento, solo con el tipo de microalga, teniendo en cuenta que *N. oculata* está clasificada en la clase Eustigmatophyceae que agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) (Ávila-Morales, 2015). Con proteínas, los porcentajes más altos se encontraron con una irradiancia de $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, encontrando para *N. oculata* porcentajes de 28.6-30.4% en ambas fases de crecimiento, mientras que con *C. vulgaris* se obtuvo 29.8 % solo en fase exponencial. Con carbohidratos se encontró efecto de la irradiancia y la fase de crecimiento, obteniendo 41.9% con *C. vulgaris* a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase exponencial. Se observó que la irradiancia es un factor que afecta la composición bioquímica de las microalgas, Garatachia-Vargas (2018) menciona que la producción de carbohidratos se incrementa de manera proporcional al aumento de la irradiancia.

Lo que concuerda con lo mencionado por Schulze *et al.* (2016) quién menciona que, a mayor irradiancia, los carbohidratos aumentan y disminuye la proteína, sumado a esto Kannah *et al.*, (2021) menciona que la cantidad de proteína acumulada en la célula de la microalga puede diferir entre sí y variar dependiendo de los factores: condiciones de crecimiento y estrés nutricional. Además, agrega que las microalgas cultivadas en agua dulce tienen un alto contenido de aminoácidos con ingredientes de azufre en comparación con las algas marinas. La cantidad de proteína encontrada en este estudio (16.6 a 30.4% a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se encuentran dentro de lo reportado por Paes *et al.* (2016), quién obtuvo valores de 16.6-35.8% en medio establecido Conway, mientras que Schulze *et al.* (2016) reporta valores más altos con *N. oculata* (30-57%), Kanna *et al.* (2021) reporta 51.6% y Gil-Izquierdo *et al.* (2020) reporta 13.59%, con un consorcio de microalgas teniendo en cuenta que la irradiancia utilizada fue diferente, así como el medio de cultivo utilizado.

Referente a los lípidos, lo obtenido en este estudio es más alto a lo reportado por Paes *et al.* (2016) en fase exponencial, pero es más baja en fase estacionaria *C. vulgaris* y *N. oculata*. Schulze *et al.* (2016) reporta valores más altos (38-50%), mientras que Gil-Izquierdo *et al.* (2020) reporta una cantidad similar (28.09%) a la obtenida. Por el contrario, Kanna *et al.* (2021) reporta una cantidad de lípidos muy baja (4.22%) para *C. vulgaris*, argumentando que este autor no reporta condiciones de crecimiento. En cuanto a los carbohidratos la cantidad más alta obtenida en este estudio fue de 41.9% con *C. vulgaris* en fase exponencial a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que se encuentra dentro de lo reportado por Garatachia-Vargas (2018), pero valor más alto a lo reportado por Kanna *et al.* (2021) y Paes *et al.* (2016) con medio Conway, mientras que Paes *et al.* (2016) obtuvo una cantidad más alta (54.5%) en fase estacionaria con limitación de nitrógeno. Con *N. oculata* los valores encontrados en este estudio están dentro de los reportados por Paes *et al.* (2016), mientras que Schulze *et al.* (2016) reporta un intervalo amplio (7-27%) utilizando diferentes tipos de luces LED. Garatachia-Vargas (2018) reporta valores mayores a 50%.

9.6 Producción de biometano

La cantidad de biometano obtenido en el presente estudio alcanzó los 2613.95 mL CH₄ g SV⁻¹ utilizando como sustrato biomasa de *C. vulgaris* en fase exponencial, aunque el análisis estadístico no haya mostrado diferencia en la producción respecto de la fase de crecimiento, una similitud es que se produjo más biometano y más carbohidratos en la fase de crecimiento exponencial. Así mismo, el menor rendimiento se obtuvo con *N. oculata* en fase exponencial con 1696.72 mL CH₄ g SV⁻¹, los rendimientos reportados por otros autores (Alzate *et al.* 2012; Alzate *et al.* 2013; Gonzalez-calzada, 2016; Caporgno *et al.* 2016; Candía-Lomelí, 2018; Sakarika y Kornaros, 2018; Astorga *et al.* 2019; Oleszek y Krzemińska, 2021; González *et al.* 2022) con microalgas sin pretratamiento o con pretratamiento (hidrólisis térmica, ultrasonido, químico, etc.) como sustrato son menores a 417 mL CH₄ g SV⁻¹, a excepción de los sustratos (microalgas) en los que se utilizaron enzimas como pretratamiento (Córdova *et al.* 2017), donde se alcanzaron los 1425 mL CH₄ g SV⁻¹ (*Scenedesmus obliquus*) y 1545 mL CH₄ g SV⁻¹ (*Arthrospira máxima*), con *C. vulgaris* solo se obtuvieron 600 mL CH₄ gSV⁻¹, utilizando otros sustratos como estrella de mar (Gurung y Oh, 2012), aceite de colza (González *et al.* 2022) y estiércol de ganado (Ali *et al.* 2020) se han obtenido 617, 740 y 673.44 mL CH₄ g SV⁻¹, respectivamente. En el caso de los residuos de la cocina Zhao *et al.* (2019) obtuvieron de 1324 a 1480 mL CH₄ gSV⁻¹ y con residuos orgánicos (amaranto, quinua y trigo), Meneses-Quelal *et al.* (2022) reportan 341.86 mL CH₄ gSV⁻¹. Los pretratamientos utilizados en los estudios revisados son pretratamientos térmicos, biológicos y químicos (Sosa), pero en ninguno se ha encontrado un rendimiento como el obtenido en este estudio, donde se utilizó un pretratamiento con ultrasonido.

En caso del inóculo, en este estudio se utilizó un lodo procesado de un rastro porcino, cabe mencionar que la concentración de amonio era de 4000 mg L⁻¹ y un pH inicial de 7 y finalizó en 8, así mismo, Alzate *et al.* (2012) y Caporgno *et al.*

(2016) mencionan que el límite de amonio es de 1500 mg L⁻¹, y si se sobrepasa esta cantidad, hay inhibición, aunque Alzate *et al.* (2012) menciona que este límite se puede extender hasta los 3000 mg L⁻¹. Torrecilla del rey (2021) menciona que concentraciones de amoníaco por encima de 3000 mg L⁻¹ pueden tener un efecto tóxico sobre el proceso, que puede agravarse si la temperatura es alta y el pH básico, ya que de esa forma se favorece el paso del ion amonio a amoníaco. Sin embargo, se pueden tolerar concentraciones más altas de amonio si el inóculo está bien adaptado y se mantiene un pH cercano a la neutralidad. Además encontró en purines de cerdo (Torrecilla del rey, 2021) concentraciones de amonio de 1755 mg L⁻¹ (cerdo ibérico) y 6429.28 mg L⁻¹ (cerdo blanco), una observación importante la realizó en el proceso de producción de biometano, ya que la producción fue más lenta con el purín de cerdo blanco, pero obtuvo mayor cantidad de biogas con este, por lo que concluyó en una mayor adaptación de los microorganismos a la concentración de amonio. Un estudio mas antiguo (Campos-Pozuelo, 2001) menciona que el proceso de producción de biogas puede llevarse hasta los 6000 mg NH₄⁺ L⁻¹ en el rango termofílico, pero que a partir de esta concentración la producción de gas es seriamente afectada. Los inóculos utilizados en diversos estudios son lodos activados provenientes de un digestor anaerobio (Alzate *et al.* 2013; Alzate *et al.* 2013; Gonzalez-calzada, 2016; Zhao *et al.* 2019), lodo granular anaerobio de un reactor que trata vinazas tequileras (Candía-Lomelí, 2018), inóculo proveniente de una planta de biogas (Oleszek y Krzemińska, 2021), lodo digerido de plantas de tratamiento de aguas residuales (Caporgno *et al.* 2016; Sakarika y Kornaros, 2018), excreta de vaca (Ali *et al.* 2020; López-Aguilar *et al.* 2021), estiércol del oveja (Ali *et al.* 2020) y excreta de cerdo (Astorga *et al.* 2019; Guo *et al.* 2020; Hu *et al.* 2021). Casi todos los autores utilizan una condición mesofílica (Alzate *et al.* 2012; Alzate *et al.* 2013; Gonzalez-calzada, 2016; Caporgno *et al.* 2016; Córdova *et al.* 2017; Candía-Lomelí, 2018; Astorga *et al.* 2019; Oleszek y Krzemińska, 2021; González *et al.* 2022; Gurung y Oh 2012; Zhao *et al.* 2019; Guo *et al.* 2020), a excepción de López-Aguilar *et al.* (2021), quienes obtienen su producción a temperatura ambiente (5-27°C). El

interés por el uso de sustratos (algas) provenientes de aguas residuales, principalmente de acuicultura es creciente, debido a los diversos usos que se les puede dar, como la producción de biocombustibles o para la extracción de compuestos de alto valor (Campanati *et al.* 2022), en el caso de la producción de biometano se han realizado investigaciones con algas cultivadas en aguas residuales urbanas (Astorga *et al.* 2019) y en aguas residuales de un digestor de estiércol de pollo (Moungmoon *et al.* 2020), y de acuerdo con Hu *et al.* (2021) y Campanati *et al.* (2022) se realiza el reciclaje de nutrientes.

La producción de biometano implicó un tiempo de producción de 60 días, de los cuales, los primeros 16-17 días fueron de adaptación de los microorganismos utilizando como sustrato biomasa cosechada en fase estacionaria, y de 21-22 días para el sustrato biomasa cosechada en fase exponencial (Tabla 30, Fig. 45). El tiempo de adaptación encontrado está dentro de lo reportado por otros autores: de 25.44 días (Gurung y Oh, 2012), de 0 a 25 días de acuerdo a las combinaciones realizadas con diferentes residuos y bentonita (Zhao *et al.* 2019), de 4.9-16.4 días con una relación sustrato:inóculo 1:1 y 1:2, respectivamente (López-Aguilar *et al.* 2021), mientras que Astorga *et al.* (2019) encontró un tiempo de adaptación de 14 días. En algunas investigaciones se realiza la adaptación del inóculo por lo que no se muestra una fase de adaptación (Alzate *et al.*, 2013, Caporgno *et al.*, 2016 Candia-Lomelí, 2018), mientras que Gonzalez-calzada (2016) desestimó esta fase (adaptación). La producción fue evaluada con el Modelo de Gompertz modificado, donde se pudo observar que la producción de biometano a lo largo del tiempo fue ajustada perfectamente, este modelo ha sido ampliamente utilizado en diferentes investigaciones sobre producción de biogás (González *et al.* 2022; Gurung y Oh, 2012; Zhao *et al.* 2019; Pečar y Goršek 2020; López-Aguilar *et al.* 2021; Guo *et al.* 2020; Meneses-Quelal *et al.* 2022). De la producción de biometano teórico calculado Angelidaki y Sanders (2004) reportan que los lípidos tienen un mayor potencial de producción de biometano de alrededor de 1014 mL CH₄ g SV⁻¹, las proteínas de 496 mL CH₄ g SV⁻¹ y los carbohidratos de 415 mL CH₄ g SV⁻¹, en

este estudio se encontraron valores más altos para los lípidos y carbohidratos, y más bajos para las proteínas (Tabla 32).

Respecto al balance energético, este fue negativo ya que solo se alcanzó a cubrir el 1.34% de la energía consumida durante los 45 días de producción, y en los días en los que se alcanzó la máxima producción se alcanzó a cubrir hasta el 5.77% de la energía consumida diaria. Alzate *et al.* (2013) menciona que para que un proceso sea autosuficiente en energía con microalgas, debe haber una concentración mínima de ST kg⁻¹, por lo que es necesario un fuerte proceso de concentración, proceso que implica un sobrecoste de operación y que es recomendable utilizar biomasa residual después de la extracción de lípidos, Villaraldo-Falfán (2018) menciona que solo alcanzó a cubrir del 5 al 8% de la energía utilizada en el pretratamiento térmico con cascáras de naranja. Panigrahi y Kumar-Dubey (2019), Chen *et al.* (2021) y Carrillo-Reyes *et al.* (2021) encontraron un balance positivo con desechos de jardín, estiércol de pollo y con microalgas provenientes de aguas residuales, respectivamente, en este último se especifica el tiempo máximo de retención hidráulica de 30 días.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que el tiempo en el que se alcanzan las fases exponencial y estacionaria no fueron influenciados por la luz, pero sí el crecimiento celular obteniendo las densidades celulares más altas a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en fase estacionaria: con el control (MBB), alcanzando $8.17 \times 10^7 \pm 3.50 \times 10^6$ y $1.05 \times 10^8 \pm 6.36 \times 10^5$ cel mL^{-1} con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente, y con efluente $4.62 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^5$ y $4.45 \times 10^7 \pm 2.33 \times 10^6$ cel mL^{-1} con *C. vulgaris* y *N. oculata*, respectivamente. La combinación irradiancia ($72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y fase estacionaria fueron mejor para remover nitratos, fosfatos y DQO, con $>80 \%$, $25-50 \%$ y $>82 \%$, respectivamente. Mientras que para el amonio y el nitrito las eficiencias de remoción más altas se obtuvieron a $40.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en las fases exponencial ($>79.2\%$) y estacionaria ($> 92.1\%$) con ambas microalgas. La remoción de contaminantes (nutrientes) fue influenciada por la irradiancia, removiendo principalmente nitrato, fosfato y DQO con una intensidad alta y, amonio y nitrito con una intensidad baja.

Las microalgas (*C. vulgaris* y *N. oculata*) deben cultivarse de acuerdo con la biomolécula requerida, puesto que *N. oculata* produce más lípidos en ambas condiciones de irradiancia y fases de crecimiento, las dos microalgas producen más proteína en fase exponencial a una irradiancia de 40.5 $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la mayor cantidad de carbohidratos se obtiene con *C. vulgaris* en fase exponencial a $72.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El sustrato biomasa de *C. vulgaris* fue el mejor en la producción de biometano, con una producción de $2613.95 \text{ mL CH}_4 \text{ g SV}^{-1}$ (*C. vulgaris* EXP) y $2014.74 \text{ mL CH}_4 \text{ g SV}^{-1}$ (*C. vulgaris* EST). El comportamiento cinético de la producción de biometano se ajustó al modelo de Gompertz modificado, obteniendo un excelente ajuste. En cuanto al balance energético, este fue negativo.

11. LITERATURA CITADA

- Abbasi, T., Tauseef, S. M., & Abbasi, S. (2012). Biogas and biogas energy: an introduction. *Biogas Energy*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1040-9>
- Aguilar-Ruiz R.J., Martínez-Macias M.R., Sánchez-Machado D.I., López-Cervantes J., Dévora-Isiordia G.E. y Nateras-Ramírez O. (2020). Removal of copper improves the lipid content in *Nannochloropsis oculata* culture. *Environ Sci Pollut Res*, 27: 44195–44204. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10283-4>
- Ali, M. M., Ndongo, M., Yetilmezsoy, K., Bahramian, M., Bilal, B., Youm, I., & Goncaloğlu, B. İ. (2020). Appraisal of methane production and anaerobic fermentation kinetics of livestock manures using artificial neural networks and sinusoidal growth functions. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01130-2>
- Álvarez-Meza, Y. (2017). Determinación del contenido proteico de biomasa húmeda y harina de tres especies de microalgas marinas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis striata*, en el laboratorio de la UNAM – filial ILO, durante el 2017. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Moquegua]. <https://repositorio.unam.edu.pe/handle/UNAM/63>
- Alzate, M. E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., & Pérez-Elvira, S. I. (2012). *Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment*. *Bioresource Technology*, 123, 488–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.113>
- Alzate, M. E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., & Pérez-Elvira, S. I. (2013). *Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction*. *Chemical Engineering Journal*, 243, 405–410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.076>
- Angelidaki, I. y Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3, 117–129. <https://www.researchgate.net/publication/225249844>
- Arana-Zevallos, F. E. (2021). Diseño de un biodigestor automatizado para la producción de biogás usando desechos orgánicos para el distrito de Chacapampa. Universidad Nacional del centro de Perú, Tesis de Licenciatura. Perú. https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/7125/T010_45658666_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Arredondo-Vega, B.O. y Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México. 97 p.
- Astorga, M., Cesano, M., Bartucci, S.L., Otaño, S., Camacho, A. y Gatti., M.N. (2019). Utilización de macroalgas de agua dulce en el tratamiento de aguas residuales urbanas y como cosustrato en la biodigestión anaeróbica de purines de cerdo. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental Argentina y Medio Ambiente 2019. Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/10054>
- Avila-Morales, B. B. (2015). Caracterización del perfil lipídico de la microalga *Nannochloropsis oculata* por GC-MS. [Tesis de licenciatura, Instituto Politécnico Nacional]. México. <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/24523/1/TESIS%20COMPLET A%20251115%20BARBARA.pdf>
- Beuckels A., Smolders E. y Muylaert K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., y Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476–1493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Calderini M. L., Stevcic C., Taipale S. y Pulkkinen K. (2021). Filtration of Nordic recirculating aquaculture system wastewater: Effects on microalgal growth, nutrient removal, and nutritional value. *Algal Research* 60, 102486. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102486>
- Campanati, C., Willer, D., Schubert, J. y Aldridge, D.C. (2022). Sustainable Intensification of Aquaculture through Nutrient Recycling and Circular Economies: More Fish, Less Waste, Blue Growth. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 30 (2), 143-169. <https://doi.org/10.1080/23308249.2021.1897520>
- Campos-Pozuelo, A.E. (2001) Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis de doctorado, Universidad de Lleida, España. Pp. 371 <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8229/Tecp1de1.pdf>
- Candía-Lomelí, M. (2018). Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás. [Tesis de maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y

Tecnológica, A.C.].
<https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/2040/1/TMIPICT C3M52018.pdf>

- Caporgno, M. P., Olkiewicz, M., Fortuny, A., Stüber, F., Fabregat, A., Font, J., Pruvost, J., Lepine, O., Legrand, J. y Bengoa, C. (2016). Evaluation of different strategies to produce biofuels from *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Fuel Processing Technology*, 144, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.12.026>.
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Arcila, J. S., y López-Gómez, M. O. (2021). Thermophilic biogas production from microalgae-bacteria aggregates: biogas yield, community variation and energy balance. *Chemosphere*, 275, 129898. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129898>
- Cengels, Y. A. y Boles, M. A. (2012). *Termodinámica*. 7ª edición. Ed. Mc Graw Hill. España.
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. y Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* Sp. y *Scenedesmus* Sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas*, 38 (2), 94 – 108. http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/bolcib/v38n2/art_03.pdf
- Chadwick D.R., Acierno R., Jean-Paul B. y Roque-d'Orbcastel E. (2014). *Manual on effluent treatment in aquaculture: Science and Practice*. Aquaetreat. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/29494856>
- Chatla D., Padmavathi P. y Srinu G. (2020) *Wastewater Treatment Techniques for Sustainable Aquaculture*. En: *Waste Management as Economic Industry Towards Circular Economy*. (S.K. Ghosh, Ed.) Springer, Singapore. pp. 159-166. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1620-7_17
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.-J., y Chang, J.-S. (2011). *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review*. *Bioresource Technology*, 102(1): 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chen, J., Li, J., Ye, B., Zhang, X., Tyagi, R. D., y Gao, X. (2021). Energy balance assessment on chicken manure for biogas production in Rabat-Salé-Zemmour-Zaïr of Morocco. *Journal of Environmental Management*, 299, 113656. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113656>
- Chow, F. (2012). *Nitrate Assimilation: The Role of In Vitro Nitrate Reductase Assay as Nutritional Predictor*, Applied Photosynthesis (Dr. Mohammad Najafpour,

Ed.). <http://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/nitrate-assimilation-the-role-of- invitro-nitrate-reductase-assay-as-nutritional-predictor>

Córdova, O., Santis, J., Ruiz-Fillipi, G., Zuñiga, M. E., Feroso, F. G., y Chamy, R. (2017). Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82: 2806–2813. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.005>

Durazno-Coronel, A. D. (2018). Valoración de estiércol bovino y porcino en la producción de biogás en un biodigestor de producción por etapas. [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana] Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15445/1/UPS-CT007585.pdf>

El-Sheekh M., Khairy H., Gheda S. y El-Shenody R. (2016). Application of Plackett-Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 42, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.001>

FAO (1979). Esquema de un programa de investigación aplicada y Desarrollo experimental para el Centro Regional Latinoamericano de Acuicultura. Roma. (11 de Enero 2022). Índice (fao.org) <https://www.fao.org/3/L5902S/l5902s00.htm#Contents>

FAO (2019). Guía teórico-práctica sobre el biogás y los biodigestores. Colección Documentos Técnicos N° 12. Buenos Aires. 104 pp. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CA5082ES/>

FAO (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

FAO (2021). Declaración de 2021 del Comité de Pesca en Favor de la Pesca y la Acuicultura Sostenibles. Organización de las Naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Declaración. Roma, Italia, 18 pp. <https://doi.org/10.4060/cb3767es>

Ferrer-Álvarez, Y. I., Ortega-Clemente, L. A., Pérez-Legaspi, I.A., Hernández-Vergara, M. P., Robledo-Narváez, P. N., Ríos-Leal, E. y 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. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14421>

Flores-Salgado, G, Thalasso, F, Buitrón, G, Vital-Jacome, M, Quijano, G. (2020). Kinetic characterization of microalgal-bacterial systems: contributions of

microalgae and heterotrophic bacteria to the oxygen balance in wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107819>

- Gabriel, D. y Sierra, H. (2017). Purificación y usos del biogás. Universidad de Barcelona, España. (3 de Noviembre de 2021]. https://books.google.com.mx/books?id=K1loDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=purificacion+y+usos+del+biogas&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=purificacion%20y%20usos%20del%20biogas&f=false
- Garatachia-Vargas M. (2018). Comparación de dos cultivos de microalgas en efluente residual acuícola para la producción de bioethanol a partir de biomasa. Tesis de maestría. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz, México. 99 pp.
- Gil-Izquierdo A., Pedreño M.A., Montoro-García S., Tárraga-Martínez M., Iglesias P., Ferreres F., Barceló D., Núñez-Delicado E. y Gabaldón J.A. (2020). A sustainable approach by using microalgae to minimize the eutrophication process of mar Menor lagoon, *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143613>
- Gómez-Castillo, C. V. y Rodríguez-Manrique, J. C. (2012). Efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en un sistema de cultivo Raceway AWL de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la obtención de aceite. [Tesis de licenciatura, Universidad Católica de Santa María]. Perú. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/3783>
- Gonzalez-Calzada, A. (2016). Producción de biogás a partir de microalgas y cianobacterias: Efecto de los pretratamientos térmico y alcalino. Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Catalunya. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/106149/Memoria%20TFM_Gonzalez_Calzada_Alejandro.pdf
- González, J. F., Parralejo, A. I., González, J., Álvarez, A., y Sabio, E. (2022). Optimization of the production and quality of biogas in the anaerobic digestion of different types of biomass in a batch laboratory biodigester and pilot plant: Numerical modeling, kinetic study and hydrogen potential. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47 (93): 39386-39403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.09.113>
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal Nutrition. En: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology (A. Richmond, Ed.). Ed. Blackwell Publishing Ltd, USA, pp. 97-115. <https://algatex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>

- Guo, H.G., Chen, Q.L., Hu, H.W., y He, J.Z. (2020). High-solid anaerobic co-digestion of pig manure with lignite promotes methane production. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120695. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120695>
- Gurung, A. y Oh, S. (2012). Recovery of Sustainable Renewable Energy from Marine Biomass. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 45(2): 156-161. <https://www.researchgate.net/publication/264034610>
- Guzmán-Luna, P., Gerbens-Leenes, P.W. y Vaca-Jiménez, S.D. (2021). The water, energy, and land footprint of tilapia aquaculture in Mexico, a comparison of the footprints of fish and meat. *Resources, Conservation & Recycling*, 165: 105224. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105224>
- Halim, R., Danquah, M.K., y Webley, P.A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3): 709–732. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.
- Haritz, H. B. y Takriff, M. S. (2017). Palm oil mill effluent treatment and CO₂ sequestration by using microalgae-sustainable strategies for environmental protection. *Environ Sci Pollut Res* 24, 20209-20240. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9742-6>
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49 (2), 157-173. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hu, J., Hu, R., Qi, D. y Lu, X. (2017). Study on treatment of aquaculture wastewater using a hybrid constructed wetland. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 61, 012015. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/61/1/012015>
- Hu, Y., Kumar, M., Wang, Z., Zhan, X., y Stengel, D. B. (2021). Filamentous microalgae as an advantageous co-substrate for enhanced methane production and digestate dewaterability in anaerobic co-digestion of pig manure. *Waste Management*, 119, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.041>
- Iriarte J. L., Quiñones R. A., González R. R. y Valenzuela C. P. (2007). Relación entre actividad enzimática y biomasa de ensamblajes fitoplanctónicos en el Sistema pelágico. *Invest. Mar., Valparaíso* 35 (1), 71-84. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782007000100006>

- Jaramillo-Gutiérrez, M. J. y Tamayo-Mateus, D. F. (2019). Evaluación de la producción de biogás a partir de lodos residuales recolectados de una PTAR, en un reactor de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana.
<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7389/1/6141293-2019-1-IQ.pdf>
- Kannah, R.Y., Kavitha, S., Karthikeyan, O.P., Rene, E.R., Kumar, G. y Banu, J.R. (2021). A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. *Bioresource Technology*, 332: 125055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125055>.
- Kube, M., Jefferson, B. Fan, L. y Roddick, F. (2018). The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Algal Research* 31, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.009>
- Kumaran, M., Palanisamy, K., Bhuyar, P., Maniam, G., Rahim, M. y Govindan, N. (2023). Agriculture of microalgae *Chlorella vulgaris* for polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production employing palm oil mill effluents (POME) for future food, wastewater, and energy nexus. *Energy nexus*, 9: 100169. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100169>
- Li, Z., Yu, E., Zhang, K., Gong, W., Xia, Y., Tian, J., Wang G. y Xie J. (2020). Water Treatment Effect, Microbial Community Structure, and Metabolic Characteristics in a Field-Scale Aquaculture Wastewater Treatment System. *Front. Microbiol.*, 11: 930. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00930>
- Lin, Y., Jing S., Lee D. y Wang T. (2002). Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture* 209 (1-4), 169 – 184. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00801-8)
- Lin, W., Li, P., Liao, Z. y Luo, J. (2016). Detoxification of ammonium to *Nannochloropsis oculata* and enhancement of lipid production by mixotrophic growth with acetate. *Bioresource Technology*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.093>
- López-Aguilar, H., Barrón, A., Franco, M., Paz, A. y Pérez-Hernández, A. (2021). Modelación de la generación de metano a partir de suero lácteo y excreta de ganado en codigestión anaerobia. *Nova Scientia, Revista de Investigación de la Universidad de La Salle Bajío*, 27(13): 1-17. <https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2791>

- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F. y Restrepo-Betancur, L.F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29 (2): 180-198. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v29n2/ind02217.pdf>
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A.L., Aguilar-Juárez, O., Senés-Guerrero, C., Orozco-Nunnally, A., Carrillo-Nieves, D. y Gradilla-Hernández, M.S. (2022a). Microalgae-based livestock wastewater treatment (MbWT) as a circular bioeconomy approach: Enhancement of biomass productivity, pollutant removal and high-value compound production. *Journal of Environmental Management* 308, 114612. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612>
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A.L., Zárate-Aranda, J.E., Yebra-Montes, C., Orozco-Nunnally, D.A., Carrillo-Nieves, D. y Gradilla-Hernández, M.S. (2022b). Microalgae-mediated bioremediation of cattle, swine and poultry digestates using mono- and mixed-cultures coupled with an optimal mixture design. *Algal Research* 64, 102717. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102717>
- Martínez-Cordero, F.J., Delgadillo, T.S., Sanchez-Zazueta, E. y Cai, J. (2021). *Tilapia aquaculture in Mexico: assessment with a focus on social and economic performance*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1219. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb3290en>
- Martínez-Macias, M.R., Correa-Murrieta, M.A., Villegas-Peralta, Y., Dévora-Isiordia, G.E., Álvarez-Sánchez, J., Saldivar-Cabrales, J. y Sánchez-Duarte, R.G. (2019). Uptake of copper from acid mine drainage by the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 6311-6318. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3963-1>
- Medina-Aguilar, F. J. (2016). Ensayo cinético de la Nitrato Reductasa en *Ulva rotundata* Bliding. [Tesis Final de maestría, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. España. 34 pp. <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/71044/2/0731787-00000-0000.pdf.pdf>
- Meneses-Quelal, W.O., Velázquez-Martí, B., Gaibor-Chávez, J., Niño-Ruiz, Z. y Ferrer-Gisbert, A. (2022). Anaerobic Co-digestion of Slaughter Residues with Agricultural Waste of Amaranth Quinoa and Wheat. *Bioenerg. Res.*, 15: 1649–1663. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10350-9>
- Moungmoon, T., Chaichana, C., Pumas, C., Pathom-aree, W., Ruangrit, K., y Pekkoh, J. (2020). Quantitative analysis of methane and glycolate production from microalgae using undiluted wastewater obtained from chicken-manure

biogas digester. *Science of The Total Environment*, 714: 136577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136577>

Nichols, H. W. (1973). Growth media-freshwater. En: Stein J. R. (Ed.), *Handbook of physiological methods*. Cambridge University Press. 7-24.

Oleszek, M. y Kozachok, S. (2018). Antioxidant activity of plant extracts and their effect on methane fermentation in bioreactors. *Int. Agrophys.*, 32(3): 395–401. <https://doi.org/10.1515/intag-2017-0031>

Oleszek, M. y Krzemińska, I. (2021). Biogas production from high-protein and rigid cell wall microalgal biomasses: Ultrasonication and FT-IR evaluation of pretreatment effects. *Fuel*, 296: 120676. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120676>

Oscanoa-Huaynate, A., Cervantes-Gallegos, M., Flores-Ramos, L. y Ruiz-Soto, A. (2021). Evaluación del potencial de *Desmodesmus asymmetricus* y *Chlorella vulgaris* para la remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales. *Revista peruana de biología* 28 (1), e18082. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v28i1.18082>

Paes, C.R.P.S., Faria, G.R., Tinoco, N.A.B., Castro, D.J.F.A., Barbarino, E. y Lourenço, S. O. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44 (2), 275-292. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue2-fulltext-9>

Palacios-Sánchez, K. M., Aguilar, A. J. y Po-Yuan, H. (2022). Ritmo de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* usando diferentes concentraciones de salinidad y F^o Guillard en 10 y 23 días de cultivo. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional de Nicaragua. León, Nicaragua. 77 pp.

Panigrahi, S., y Kumar-Dubey, B. (2019). Electrochemical pretreatment of yard waste to improve biogas production: understanding the mechanism of delignification, and energy balance. *Bioresource Technology*, 292: 121958. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121958>

Parsy, A., Sambusiti, C., Baldoni-Andrey, P., Thomas, T., y Périé F. (2020). Cultivation of *Nannochloropsis oculata* in saline oil & gas wastewater supplemented with anaerobic digestion effluent as nutrient source. *Algal Research* 50, 101966. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101966>

- Pečar, D., y Goršek, A. (2020). Kinetics of methane production during anaerobic digestion of chicken manure with sawdust and miscanthus. *Biomass and Bioenergy*, 143, 105820. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105820>
- Pérez-Legaspi, I. A., Valadez-Rocha, V., Ortega-Clemente, L. A., y Jiménez-García, M. I. (2019). Microalgal pigment induction and transfer in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–21. doi: 10.1111/raq.12384
- Pica-Granados, Y., Ronco, A. y Díaz, M.C. (2004). Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones (G. Castillo, Ed.). IMTA, México. pp. 54-63. <https://www.idrc.ca/sites/default/files/openbooks/147-7/index.html>
- Programa sectorial de Energía, 2020-2024, Secretaría de Gobernación; Estados Unidos Mexicanos; DOF 08/07/2020; [Citado el 09 de Agosto de 2023]; disponible en version HTML en internet: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5596374&fecha=08/07/2020#gsc.tab=0
- Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M. E., y Vélez-Salazar, Y. (2015). Microalgas para la industria alimenticia. Ed. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. 70 pp. <http://hdl.handle.net/20.500.11912/2306>
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Blackwell Science, USA. p. 112. <https://algatex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- Rizza, L.S., Coronel, C.D., Sanz Smachetti, M.E., Nascimento, M.D., y Curatti, L., (2019). A semi-closed loop microalgal biomass production-platform for ethanol from renewable sources of nitrogen and phosphorous, *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.311>.
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Romero, J., Seco, A. y Ferrer, J. (2015). Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression. *Bioresource Technology* 175, 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.081>
- Sakarika, M. y Kornaros, M. (2018). *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production, *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.11.017>

- Schulze, P. S. C., Pereira, H. G. C., Santos, T. F. C., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., Perales, J.A., Varela, J. C. S. (2016). Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, 16, 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034>
- Sealy H. (2021). Documento informativo sobre las directrices/normas de gestión de nutrientes para los vertidos de aguas residuales en la región del Gran Caribe. ONU Programa para el medio ambiente. UNEP(DEPI)/CAR WG.41/INF.23. 57 pp. <https://gefcrew.org/carrcu/LBSSTAC5/Info-Docs/WG.41INF.23-es.pdf>
- SEMARNAT (2022). Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021. Límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, México. 11 de marzo de 2022.
- Singh, D., Upadhyay, A. K., Singh, R. y Singh, D. P. (2022). Implication of municipal wastewater on growth kinetics, biochemical profile, and defense system of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Technology & Innovation*, 26: 102334. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102334>
- Sourget, Q., Zonno, V. y Blancheton, J. P. (2014). Effluent water treatment: Algal ponds. En: Chadwick, D. R.(Ed.), *Manual on effluent treatment in aquaculture: Science and Practice* (pp. 45-52). *Aquaetreat*. <https://www.researchgate.net/publication/29494856>
- Stein, J.R. (1979). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge, Univ. Pres, pp. 446
- Tebanni, S., Lopes, F., Filali, R., Dumur, D. y Pareau, D. (2020). *Biofijación de CO₂ por microalgas. Modelado, estimación y control*. Gran Bretaña: ISTE International.
- Torrecilla del Rey, A. (2021). *Potencial de distintos residuos orgánicos en la producción de biogás vía digestión y codigestión anaerobia*. [Tesis de maestría, Universidad de Valladolid]. España. 75 pp. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/48763/TFG-I-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- UN (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. Resumen. New York, USA. 38 pp. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.

https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf

- Vanegas, J. y Hernández-Benítez, R.E. (2018). Potencial biotecnológico de microalgas en zonas áridas. Primera edición. Fonseca, La Guajira: Servicio Nacional de aprendizaje (SENA). Centro Agroempresarial y Acuícola. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/5697/potencial_biotecnologico_microalgas.pdf;jsessionid=0D1B5CCB505B0DEAEA6078F0033B1F6B?sequence=1
- Villaraldo-Falfán, L. (2018). Balance comparativo del proceso de generación de biogás a partir de un lodo residual y un lodo residual pretratado. [Tesis de maestría, Tecnológico Nacional de México]. México. <http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/handle/123456789/288>
- Yamada, T. y Sakaguchi, K. (1982). Comparative studies on *Chlorella* cell walls: induction of protoplast formation. Arch. Microbiol., 132: 10–13. <https://www.researchgate.net/publication/225897661>
- Yao, B., Xi, B. D., Hu, C.M., Huo, S. L., Su, J. y Liu, H. L. (2011). A model and experimental study of phosphate uptake kinetics in algae: Considering surface adsorption and P-stress. Journal of Environmental Sciences, 23 (2): 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60392-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60392-0)
- Yeo, S. Binkowski, F. y Morris, J. (2004). Aquaculture Effluents and Waste By-Products Characteristics, Potential Recovery, and Beneficial Reuse. NCRAC Technical Bulletins. 6 [en línea]. <https://dr.lib.iastate.edu/entities/publication/58593714-ff4e-45f8-aac2-d67834b99d46> 12/12/2022
- Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Zhang, Y. y Qi. X. (2020). Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 117: 109503. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109503>
- Zhao, T., Chen, Y., Yu, Q., Shi, D., Chai, H., Li, L., Ai, H., Gu, L. y He, Q. (2019). Enhancement of performance and stability of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and kitchen waste by using bentonite. PLOS ONE, 14(7): e0218856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218856>

12. ANEXO A. MEDIO BASAL BOLD (MBB)

Compuestos del medio Basal Bold (Nichols, 1973)

MACRONUTRIENTES	g L⁻¹
NaNO ₃	0.25
CaCl ₂	0.025
MgSO ₄	0.075
K ₂ HPO ₄	0.075
KH ₂ PO ₄	0.175
NaCl	0.025

MICRONUTRIENTES	mL L⁻¹
Vitaminas	2
Metales traza	2