

# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERIA EN ACUICULTURA

## TESIS

**OPTIMIZACIÓN EN CULTIVO BATCH DE CEPAS  
NATIVAS *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. Y  
*Monoraphidium* sp. UTILIZANDO EFLUENTE DE  
PISCICULTURA DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO EN ACUICULTURA**

**PRESENTA:  
ÁNGEL RAMÍREZ LÓPEZ**

**ASESOR DE TESIS:  
M. C. LUIS GUERRERO CABRERA**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **AL PROFESOR-INVESTIGADOR**

**M. en C. LUIS GUERRERO CABRERA**

Por brindarme el apoyo necesario para realizar este trabajo. Además le doy las gracias por tenerme paciencia y dedicarme tiempo valioso de su vida para contribuir en mi desarrollo como profesional. Gracias por creer en mí y brindarme su confianza.

### **AL PROFESOR-INVESTIGADOR**

**M. en C. JOSE ANGEL RUEDA BARRIENTOS**

Por colaborar en este trabajo y apoyarme a que fuera posible terminarlo. Además de tenerme paciencia en las tareas que me encomendaste. Gracias por tu apoyo.

### **AL PROFESOR-INVESTIGADOR**

**M. en C. EDWIN AQUINO BOLAÑOS**

Por su amistad y apoyo incondicional durante mi estancia en la universidad.

### **AL PROFESOR JAMES PATRICK KILLOUGH**

Por brindarme su apoyo y confianza. Así como por el tiempo que dispuso para ayudarme a terminar con el curso de inglés.

### **A mi compañera Rocío**

Por su apoyo y amistad incondicional. Agradezco tu compañerismo y amistad en mi estancia universitaria.

### **A los sinodales:**

DR. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ

DRA. JACQUELINE CAPATAZ TAFUR

DR. OSCAR NÚÑEZ GAONA

A todos aquellos profesores-investigadores que en algún momento contribuyeron en mi formación académica. Gracias por su apoyo y confianza.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI MADRE**

Por creer en mí y brindarme todo el apoyo necesario,

Te dedico este trabajo por brindarme tu amor e inspirarme a salir adelante, sin importar los obstáculos que nos ponga la vida.

Gracias por creer en mí.

### **A MI PADRE**

Por creer en mí desde el primer día, a demás de brindarme tu apoyo y confianza,

Te dedico este trabajo por creer plenamente en mí, a pesar de que ya no estés entre nosotros, de donde quiera que te encuentres yo se que estarás orgulloso de mí.

## INDICE

Lista de cuadros.....	II
Lista de Figuras .....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
Marco teórico .....	1
<i>Cultivo de microalgas</i> .....	2
<i>Absorción de nutrientes</i> .....	4
Planteamiento del problema .....	6
ANTECEDENTES .....	8
<i>Uso de los efluentes como fuente de nitrógeno y fósforo</i> .....	8
JUSTIFICACION.....	11
HIPOTESIS.....	13
OBJETIVOS .....	14
MATERIALES Y METODOS .....	15
<i>Aislamiento de microalgas</i> .....	16
<i>Cultivo batch con MBB y MET</i> .....	17
<i>Determinación de las constantes cinéticas</i> .....	18
<i>Obtención de biomasa</i> .....	19
<i>Análisis de datos</i> .....	20
RESULTADOS.....	21
<i>Cinéticas de crecimiento</i> .....	21
<i>Productividad</i> .....	27
<i>Optimización de <math>Q_v</math>, <math>Q_vL</math> y <math>Q_vP</math> para cada especie</i> .....	32
<i>Absorción de nutrientes</i> .....	35
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES .....	43
REFERENCIAS .....	44

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Diseño experimental 2 X 3 X 3.....	17
<b>Cuadro 2.</b> ANDEVA factorial alga-medio con las variables: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación (td) en tres especies de microalgas cultivadas.....	25
<b>Cuadro 3.</b> ANDEVA factorial alga-medio con las variables: productividad ( $Q_v$ ), productividad de lípidos ( $Q_{vL}$ ), productividad de proteínas ( $Q_{vP}$ ) en tres especies de microalgas cultivadas.....	28
<b>Cuadro 4.</b> ANDEVA factorial alga-volumen con las variables: productividad ( $Q_v$ ), productividad de lípidos ( $Q_{vL}$ ), Productividad de proteínas ( $Q_{vP}$ ) en tres especies de microalgas cultivadas.. ..	34
<b>Cuadro 5.</b> Características del medio de efluente de tilapia usado para el cultivo de microalgas.....	35

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Curva típica de crecimiento de los organismos unicelulares.....	04
<b>Figura 2.</b> Esquema general de trabajo.....	15
<b>Figura 3.</b> Cinética de crecimiento por densidad celular de <i>Chlorella</i> sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	22
<b>Figura 4.</b> Cinética de crecimiento por densidad celular de <i>Scenedesmus</i> sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	23
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento por densidad celular de <i>Monoraphidium</i> sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	24
<b>Figura 6.</b> Interacción entre medios para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	26
<b>Figura 7.</b> Producción de lípidos en biomasa en medio de efluente de tilapia y medio basal de bold usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	29
<b>Figura 8.</b> Producción de proteína en biomasa en medio de efluente de tilapia y medio Basal de Bold usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	31
<b>Figura 9.</b> Optimización estadística de las variables de respuesta.....	33
<b>Figura 10.</b> Remoción de amonio en medio de efluente de tilapia usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.....	36

## Lista de abreviaturas

(ANDEVA)	Análisis de varianza.
(FBR)	Fotobiorreactor.
(MBB)	Medio Basal de Bold.
(MET)	Medio de efluente de tilapia.
(ND)	No detectado.
(Qv)	Productividad.
(QvL)	Productividad de lípidos.
(QvP)	Productividad de proteínas.
(PET)	Tereftalato de polietileno.
(td)	Tiempo de duplicación.
( $\mu$ )	Velocidad específica de crecimiento.

## RESUMEN

Las microalgas tienen la capacidad de absorber nutrientes (nitrógeno: fósforo) presentes en el agua de desecho de diferentes actividades agropecuarias entre ellas la piscicultura, por lo que se planteó en el presente trabajo optimizar la productividad de biomasa, lípidos y proteínas de las microalgas *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp. en condiciones de cultivo batch, utilizando medio de efluente de piscicultura de tilapia y tres escalas de fotobiorreactor (FBR).

Los cultivos de microalgas se realizaron en fotobiorreactores de 1.5, 4.0, y 9.0 L utilizando medio Basal de Bold (MBB) como referencia y el medio de fluente de tilapia (MET) en condiciones controladas de luz, temperatura y aireación. Se analizaron las variables: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación (td), productividad (Qv), productividad de lípidos (QvL) y productividad de proteínas (QvP), por medio de ANDEVA factorial para analizar las interacciones alga-medio y alga-volumen. Gráficamente se observó un efecto del MET y el volumen de los FBRs en la cinética de crecimiento de las tres especies de microalgas, presentando ausencia de la fase exponencial en la curva de crecimiento. La fase exponencial y desaceleración de la curva de crecimiento solo se pudo observar en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cuando fueron cultivadas en MBB con FBRs de 1.5 y 4.0 L. Para *Chlorella* sp. la Qv óptima fue alcanzada en los FBRs de 1.5 L en MBB; su QvL óptima estuvo en los FBRs de 1.5 L sin importar el medio y su QvP se alcanzó en los FBRs de 1.5 y 4.0 L indistintamente del medio. Para el caso de *Scenedesmus* sp. la Qv, QvP y QvL óptimas estuvieron en los FBRs de 1.5 L en ambos medios. Por último para *Monoraphidium* sp. la Qv y QvP óptimas se alcanzaron en los FBRs de 1.5 L sin diferir en los medios; mientras que su QvL se alcanzó en los FBRs 1.5 L en MET. Para la eliminación del amonio de este tipo de efluentes, es conveniente utilizar a *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. por su capacidad de absorción de más del 90%.

## ABSTRACT

Microalgae has the ability to absorb nutrients (nitrogen:phosphorus) present in the wastewater of different agricultural activities including aquaculture, proposed in this study is the optimization of the productivity of biomass, lipids and proteins of the micro algae *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. and *Chlorella* sp. in conditions of batch culture, by using tilapia effluent from aquaculture and three scales of photobioreactor (FBR).

The micro algae culture was conducted in different photo bioreactor volumes of 1.5, 4.0 and 9.0 L using Bold Basal medium (BBM) as a reference and the tilapia effluent medium (TEM) under controlled conditions of light, temperature and aeration. The following variables were analyzed: specific growth rate ( $\mu$ ), doubling time (td), productivity (Qv), productivity of lipids (QvL) and productivity of proteins (QvP), by means of factorial ANOVA to analyze the interactions between algae-medium and algae-volume. The effects of the TEM and the volume of FBRs in kinetics of growth of the three species of micro algae were graphically observed, presenting absence of the exponential growth phase in the growth curve. The exponential growth phase and the asymptote of the growth curve could only be seen in *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. When cultured in FBRs BBM with 1.5 and 4.0 L. For *Chlorella* sp. the optimal Qv was reached in 1.5 L FBRs at BBM; its QvL was optimal in FBRs 1.5 L regardless of the medium, and its QvP was reached in the FBRs of 1.5 and 4.0 L regardless of the medium. In the case of *Scenedesmus* sp. the Qv and QvL were reached in the 1.5 L and for QvP was 1.5 and 4.0 L regardless of the medium for all variables. Finally for *Monoraphidium* sp. the Qv and QvP was optimized in FBRs 1.5 L without differ between mediums. It is convenient to use *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. for the elimination of the ammonia, because to their more than 90% absorption ability from this type of effluent.

# INTRODUCCIÓN

## Marco teórico

El grupo de las algas no tiene una clasificación taxonómica formal, refiere a un conjunto de organismos que no comparten un origen común pero siguen líneas evolutivas múltiples e independientes. Su estructura celular, los niveles de organización y morfología, polisacáridos de reserva o estructural y el tipo de ciclo de vida, reflejan la diversidad de organismos que incluye tanto procariotas como eucariotas. Tienen la capacidad de fotosintetizar a partir de diferentes longitudes de onda dentro del espectro de luz visible, dependiendo de los pigmentos fotosensibles que contengan, estos pueden ser desde bacterioclorofilas, carotenos, xantofilas, clorofilas, entre otros (Barsanti y Gualtieri, 2006).

De manera general, se pueden clasificar 2 grupos de algas: macroalgas y microalgas; estas últimas constituyen el fitoplancton y tienen una innegable importancia, pues son las principales productoras de oxígeno en el planeta y son el soporte de las cadenas alimenticias en los ecosistemas acuáticos. Por ende en la actualidad se estudia su potencial en áreas como la ecología acuática, acuicultura, farmacología, genética, bioquímica y biotecnología (López y Barrientos, 2005).

Debido a la posibilidad de aplicación comercial, actualmente existe un gran interés en el cultivo intensivo de las microalgas, sus aplicaciones pueden ser en distintas áreas como la nutrición humana y animal, salud humana y animal, tratamiento de aguas residuales, química para la producción de biocombustibles, farmacéutica y agricultura (Spolaore *et al.*, 2006).

En biorremediación, las comunidades de microalgas desempeñan una serie de funciones en los procesos biológicos implicados en el tratamiento de aguas residuales, particularmente en las lagunas de estabilización debido a que: proporcionan las condiciones para reducir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO); además absorben nutrientes inorgánicos como

nitrógeno (N) y fósforo (P); minimizan el crecimiento de patógenos (ej. bacterias coliformes) en ciertas densidades y mantienen en fase aeróbica a los microorganismos facultativos para el funcionamiento de estas lagunas, donde la acción mutualista de bacterias y algas degrada las grasas, proteínas y carbohidratos (Carta-Escobar *et al.*, 2004).

En la acuicultura marina y de agua dulce, las microalgas tienen importancia en la nutrición animal en el cultivo de peces, crustáceos (camarones) y moluscos, donde se requieren microalgas como alimento en las primeras etapas del ciclo de vida. Además, se utilizan en la producción y "acondicionamiento" del zooplancton como la artemia (ej. *Artemia* sp.), cladoceros (ej. *Moina* sp.) y rotíferos (ej. *Brachionus* sp.) (Wikfors y Ohno, 2001). Adicionalmente se extraen pigmentos de interés nutricional como por ejemplo carotenoides de *Dunaliella* sp. y astaxantina de *Hematococcus* sp. que también pueden ser utilizados para proveer o estimular la producción de color en peces como los salmónidos, pez dorado y carpas. Otro ejemplo es el uso de *Haslea ostrearia* como alimento en ostras para lograr una coloración verde-azul en las branquias y en palpos labiales, lo que confiere al producto un incremento del 40% de su valor (Spolaore *et al.*, 2006).

### ***Cultivo de microalgas***

Después del aislamiento, las cepas de microalgas se mantienen en condiciones artificiales en medios formulados, con luz y temperatura constantes. Básicamente existen dos técnicas para la producción de microorganismos fotoautotróficos: los sistemas abiertos, en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera; y los sistemas cerrados comúnmente denominados fotobiorreactores (FBRs), en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera (Contreras *et al.*, 2003). Un fotobiorreactor (FBR), al igual que un biorreactor, es un dispositivo en el cual los microorganismos son cultivados para

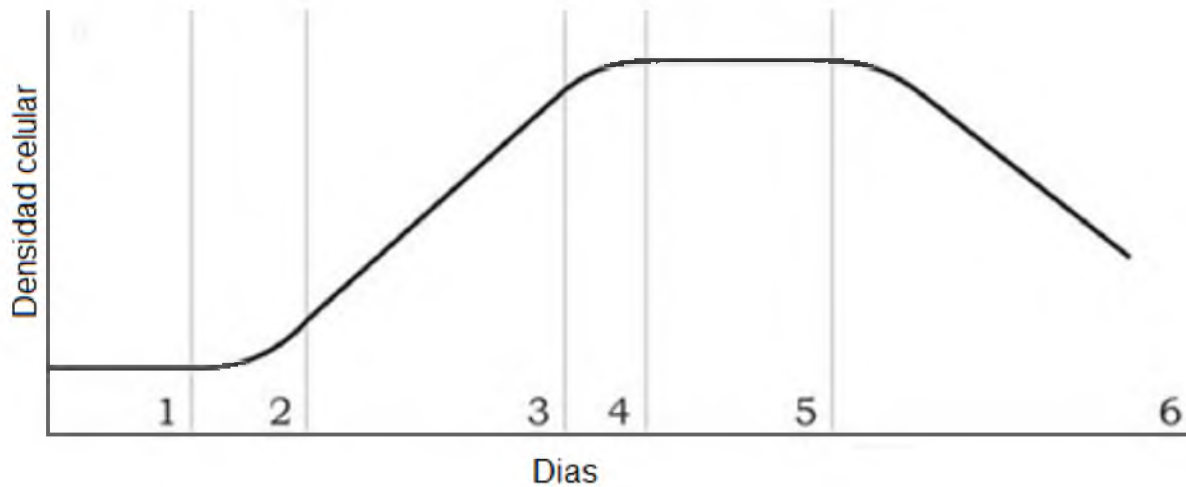
la producción de sustancias o para la conversión de desechos biogénicos, dependiente de la luz que es absorbida (Grobbelaar, 2008).

Los FBRs han recibido mucha atención, ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular tres o más veces en comparación con los sistemas abiertos. Los FBRs tienen ventajas para facilitar la cosecha de biomasa, evitan la contaminación y mejoran el control de las condiciones de cultivo (Contreras *et al.*, 2003).

En comparación con los sistemas abiertos como los estanques y raceways; en los FBRs el cultivo puede ser reproducible con respecto a las condiciones ambientales variables, la posibilidad de regulación de temperatura y bajas pérdidas de CO<sub>2</sub>.

Los cultivos discontinuos tipo batch, son aquellos en los que la población de microalgas va pasando por las distintas fases de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria) ajustándose generalmente a un crecimiento típico (Figura 1). El cultivo batch supone la cosecha completa del recipiente de cultivo y es la forma más “simple” de operar (Abalde *et al.*, 1996).

Los medios de cultivo empleados para la producción de microalgas se pueden agrupar en 3 categorías: medios completamente sintéticos; medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplementos minerales y utilización de residuos o aguas residuales (Abalde *et al.*, 1996).



**Figura 1. Curva típica de crecimiento de los organismos unicelulares.** (1) fase de latencia, (2) fase de crecimiento acelerado; (3) fase de crecimiento exponencial, (4) fase de desaceleración de crecimiento, (5) fase estacionaria, (6) fase de muerte. Tomado de Barsanti y Gualtieri (2006).

### *Absorción de nutrientes*

De manera natural en los sistemas acuáticos el crecimiento del fitoplancton depende directamente de factores como luz, temperatura, salinidad, fuente de carbono, pH y nutrientes. De estos últimos el nitrógeno, fósforo, carbono y calcio, pueden estar disponibles en diferentes formas químicas para los microorganismos; para el caso del nitrógeno las dos fuentes primarias de aprovechamiento están en forma de nitratos y amonio, a pesar de que se encuentre también en forma inorgánica como nitritos, óxido nítrico y ácido nítrico o en forma orgánica en la urea (Barrera *et al.*, 2008).

La proporción con la que estas dos formas del nitrógeno son absorbidas por las diferentes especies del fitoplancton puede variar entre ellas debido a factores ambientales o por las condiciones de cultivo como fuente de carbono y el oxígeno (Barrera *et al.*, 2008). En el caso del nitrato, este es convertido en el interior de la célula a nitrito intracelular para ser reducido a amonio en dos pasos sucesivos, catalizados

por una nitrato reductasa y una nitrito reductasa, antes de incorporarse a sus componentes orgánicos (Chen *et al.*, 2009). La preferencia por el nitrato de sodio y potasio en la formulación de medios para el crecimiento de especies microalgales de agua dulce y marina, se debe a que permite alcanzar altas tasas de crecimiento y alta productividad de biomasa. Por ejemplo, la mayoría de los trabajos para inducir la acumulación de lípidos se basan en limitar esta fuente nitrógeno bajando las concentraciones de los niveles establecidos en cada formulación (Griffiths y Harrison, 2009).

El nitrato es la fuente de nitrógeno más utilizado en los medios de cultivo, pero el amonio también se puede utilizar y es la forma preferida para algunas especies de microalgas, ya que no tiene que reducirse antes de la síntesis de aminoácidos en la asimilación de nitrógeno primario intracelular para la vinculación orgánica (Barrera *et al.*, 2008).

Las microalgas utilizan el fósforo preferentemente en forma de ortofosfato inorgánico. El glicero-fosfato se utiliza particularmente cuando en los medios de cultivos se precipita el fósforo al esterilizarse en autoclave. La mayoría de las microalgas son capaces de producir fosfatasa en la superficie celular, lo que les permite utilizar esta y otras formas de fosfato orgánico como fuente de fósforo.

Los metales trazas que son esenciales para el crecimiento de microalgas se incorporan en las moléculas orgánicas, en particular en una variedad de factores coenzimáticos que intervienen en reacciones fotosintéticas. De estos metales, las concentraciones biológicamente disponibles de hierro (Fe), magnesio (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu) y cobalto (Co) (y algunas veces molibdeno (Mo) y selenio (Se)) podrían ser limitantes para el crecimiento de las microalgas (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Por otra parte, el valor nutricional de la biomasa de microalgas depende de varios factores fisiológicos y bioquímicos, incluyendo el tamaño y la forma de las microalgas, digestibilidad y composición

bioquímica. Las diferencias en estos valores son influenciados por sus tasas de crecimiento, las fases del ciclo de vida, y condiciones de cultivo como diseño de fotobiorreactor, concentración de macronutrientes (N y P), iluminación, fotoperiodo y salinidad (Spolaore *et al.*, 2006).

### **Planteamiento del problema**

Las aguas de los efluentes contienen una serie de compuestos orgánicos e inorgánicos, variando su concentración y tipos de contaminantes, dependiendo del sector de donde provienen: acuicultura, industria del azúcar, petroquímica, servicios, química, celulosa y papel, agropecuaria, alimenticia, cerveza y malta, minería, textil, destilería y vitivinicultura, beneficio de café, curtiduría y otros giros.

En el caso del efluente de producción de piscicultura existen contaminantes como: amonio y fosfatos, alcanzando concentraciones  $>7.3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $>5.0 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente, siendo estos valores por debajo de los emitidos por las descargas municipales ( $> 20 \text{ g L}^{-1}$  y  $>50 \text{ m L}^{-1}$ ). Esto lo hace factible para aprovecharse como medio nutritivo para la producción de microalgas (Iturbide, 2008).

Por otra parte, se hace conveniente utilizar el agua de efluentes de piscicultura de tilapia como alternativa para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que el uso de fertilizantes agrícolas para la producción de microalgas lleva un alto costo por la emisión de  $\text{CO}_2$  durante su elaboración.

Sin embargo, al sustituir los medios elaborados a base de fertilizantes por un efluente de piscicultura de tilapia con menor concentración de macronutrientes como nitrógeno y fósforo, se puede afectar la cinética de crecimiento para la obtención de altas productividades de microalgas. Por ende es necesario

evaluar el rendimiento y productividad que se obtienen con estas condiciones de cultivo y establecer la utilidad real de estos efluentes.

## ANTECEDENTES

### *Uso de los efluentes como fuente de nitrógeno y fósforo*

El amonio como fuente de nitrógeno en el cultivo de microalgas es menos utilizado, son pocos los medios como el Cramer y Mayers para agua dulce y el PCR-S11 para agua marina, que utilizan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  respectivamente (Barsanti y Gualtieri, 2006); ya que por lo general, y dependiendo de las condiciones de cultivo, no siempre se alcanzan las mismas tasas de crecimiento y productividad de biomasa en comparación con el nitrato (Pacheco *et al.*, 2010).

Las concentraciones de fósforo y nitrógeno que podemos encontrar en aguas con fuentes minerales, desechos animales, desechos humanos o de actividades agrícolas, son muy variadas. En el caso de efluentes municipales y de plantas de tratamiento donde las concentraciones de estos nutrientes son altas específicamente en: concentrados de aguas residuales con 95.6 a 264.0  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio, 125.8 a 530.0  $\text{mg L}^{-1}$  de fósforo total (Min, 2011; Hu *et al.*, 2012); efluentes domésticos secundarios con 7 a 25.1  $\text{mg L}^{-1}$  de nitrógeno total, 0.04 a 1.93  $\text{mg L}^{-1}$  de fosforo total (Li *et al.*, 2010; Wu, 2013); lixiviados de tiradero a cielo abierto con 151.66  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio y 8.16  $\text{mg L}^{-1}$  de ortofosfato (Mustafa *et al.*, 2012); el agua tratada de origen municipal contiene 40.0  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio y 11.0  $\text{mg L}^{-1}$  de fósforo total (Barrera *et al.*, 2008).

Por otra parte en los efluentes de procesos productivos agropecuarios es posible encontrar altas concentraciones de N y P pero sin elementos tóxicos que permite su uso con mayor facilidad, por ejemplo 268.0  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio y 56.0  $\text{mg L}^{-1}$  de ortofosfato (Ji *et al.*, 2012); así mismo en los efluentes provenientes del procesamiento del aceite de palma, se pueden encontrar 16.16  $\text{mg L}^{-1}$  de nitrato y 15.8  $\text{mg L}^{-1}$  de ortofosfato (Vairappan y Yen, 2008); en el efluente de la actividad porcina se contienen 1,130.0  $\text{mg L}^{-1}$  de nitrógeno total y 340.0  $\text{mg L}^{-1}$  fosforo total (Kebede-Westhead *et al.*,

2006); en el efluente de tanques de peces en cultivo intensivo 5.6 mg L<sup>-1</sup> de amonio y 2.38 mg L<sup>-1</sup> de ortofosfato (Gál *et al.*, 2007); en agua residual de camaronicultura la concentración de amonio es de 0.9 mg L<sup>-1</sup> y fosfato de 0.1mg L<sup>-1</sup> (Copertino *et al.*, 2009) y efluente biofiltrado de piscicultura marina con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de amonio y 1.5 mg L<sup>-1</sup> ortofosfato (Borges *et al.*, 2005).

Para las microalgas cultivadas en este tipo de efluentes el cambio en la estrategia metabólica de la forma heterótrofa del tipo quimioheterótrofa a mixotrófica, puede llevarse a cabo por especies fotoautótrofas que son sometidas a cambios en el medio y condiciones de cultivo, donde se dispone de compuestos orgánicos que funcionan como fuente alterna de carbono y nitrógeno (Sigeo, 2005; Barsanti y Gualtieri, 2006).

Una gran variedad de especies han sido sometidas a crecimiento en este tipo de efluentes, donde se ha valorado la velocidad de crecimiento, productividad, composición bioquímica, producción de clorophila, etc. con diferentes propósitos como para la producción de lípidos y biodiesel en *Monoraphidium* sp. (Bogen *et al.*, 2013), *Scenedesmus* sp. (Xin, 2010; Wu, 2013) y *Chlorella* sp. (Ji *et al.*, 2012).

Particularmente Gál *et al.* (2007), evaluaron un sistema experimental en exterior a escala piloto combinando estanques de piscicultura intensiva de tilapia (*Oreochromis niloticus*), estanques de piscicultura extensiva con *Clarias gariepinus* y *Cyprinus carpio* y estanques de microalgas. Ellos evaluaron la producción de biomasa en los diferentes estanques del sistema, así como la absorción de nutrientes como carbono orgánico, nitrógeno y fósforo. Además notaron que los estanques de microalgas solo absorbieron nitritos y nitratos pero no el amonio y fósforo. Mientras que los estanques de producción extensiva fueron los que removieron el amonio y fósforo del sistema. Sin embargo no se ha evaluado en condiciones de interior en FBRs.

La capacidad de las microalgas en reducir altas cargas orgánicas en aguas residuales ha sido investigada en climas tropicales y templados. Se han estudiado la diversidad de especies microalgales durante las variaciones estacionales y la sucesión de plancton en las lagunas de estabilización de aguas residuales. Además, se ha observado que la densidad, biomasa y composición bioquímica de las microalgas son indicadores útiles para determinar el estado del estanque y la calidad del efluente (Barrera *et al.* 2008).

## JUSTIFICACION

La acuicultura sustentable puede hacer frente a los costos de los tratamientos de los efluentes dándole un valor adicional como insumo para producción de microalgas. En este sentido los sistemas integrados de acuicultura se consideran una tecnología prometedora, pero los esfuerzos recientes se han dedicado esencialmente a macroalgas (Borges *et al.*, 2005). Actualmente en México el tratamiento de las aguas residuales de acuicultura es obligatorio no solo para hacer frente a las regulaciones de descarga existentes, sino también para permitir la reutilización del agua de recirculación en los sistemas de acuicultura o bien para la producción de microalgas utilizando los efluentes como medio de crecimiento.

Para mejorar el proceso en la producción de microalgas se deben de seleccionar las mejores cepas de microalgas, en términos de la utilidad que se requiera; máxima productividad y adaptabilidad al tipo de agua a utilizar para el cultivo, logrando utilizar aguas de efluentes secundarios de producción piscícola. Además es de gran importancia seleccionar el tipo de FBR adecuado para tener una máxima producción de biomasa al menor costo.

Aunque en los cultivos intensivos de microalgas, el nitrógeno utilizado de los medios formulados se encuentra en forma de nitratos, se plantea la posibilidad de aprovechar el nitrógeno en forma de amonio presente en este tipo de efluentes de piscicultura de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Particularmente el efluente de piscicultura como medio de cultivo se ha evaluado en condiciones de FBR continuo o alimentado en exterior, pero no se ha probado en condiciones de interior en cultivo Batch donde sería posible medir su alcance para productividad de biomasa.

El presente trabajo evalúa la posibilidad de utilizar esta fuente de nitrógeno para reducir costos en producción y aprovechar efluentes de actividades productivas como la acuicultura, en particular

piscicultura de tilapia; lo cual puede ser un aporte en el desarrollo de técnicas de cultivo dentro de un marco de sustentabilidad. Además consideramos importante generar un cultivo para condiciones ambientales locales con el aprovechamiento de especies nativas.

## **HIPOTESIS**

Es posible utilizar los efluentes de piscicultura de tilapia para cultivo batch de microalgas empleando FBRs a escala laboratorio para la producción de biomasa, lípidos y proteínas. Esperando que la producción sea igual a la que se tiene con un medio formulado como es el Medio Basal de Bold.

## OBJETIVOS

### General

- Evaluar la productividad de biomasa, lípidos y proteínas de las microalgas *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp. en condiciones de cultivo batch, utilizando medio de efluente de piscicultura de tilapia y tres escalas de FBR.

### Particulares

- Obtener la cinética de crecimiento de las especies *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp. utilizando el medio de referencia Basal de Bold (MBB) y medio de efluente de piscicultura de tilapia (*O. Niloticus*) (MET) utilizando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.
- Determinar las constantes de la cinética de crecimiento para cada especie: Tiempo de duplicación (td), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y productividad de biomasa ( $Q_v$ ).
- Determinar la productividad de lípidos y proteínas de las especies *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp., utilizando el medio Basal de Bold y efluente de piscicultura de tilapia (*O. Niloticus*) en FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.
- Establecer las condiciones óptimas para la  $Q_v$ ,  $Q_vL$  y  $Q_vP$  de cada microalga mediante los análisis estadísticos para seleccionar la mejor especie.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio fue realizado de acuerdo al siguiente esquema general de trabajo (Figura 2).

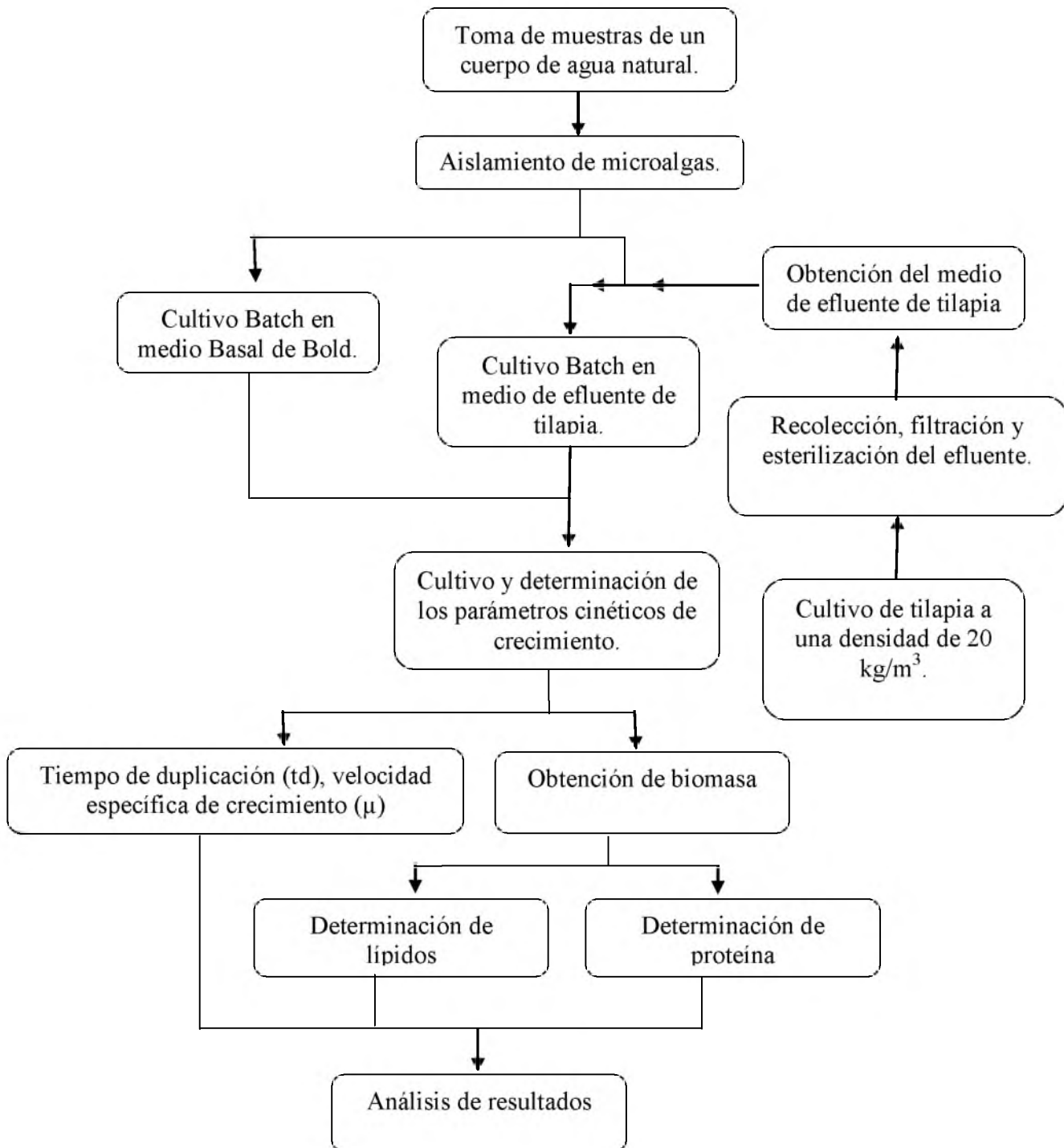


Figura 2. Esquema general de trabajo.

### *Aislamiento de microalgas*

Para la obtención de cepas de microalgas se tomaron muestras de un cuerpo de agua natural y fueron llevadas al laboratorio donde se incubaron en FBRs de matraz para su crecimiento en medio Basal de Bold (MBB). Cuando se observó un crecimiento considerable ( $200$  a  $500 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>) en el cultivo se realizaron siembras en cajas petri con agar-agar y MBB para el aislamiento de las especies presentes en la muestra. La siembra en las cajas petri, se realizó mediante un campo estéril, empleando la técnica de estriado con un asa de siembra, incubando a luz constante (lámparas Philips de 38W) y temperatura de 25 °C.

Cuando se observaron colonias de microalgas, se tomaron muestras de cada colonia con el asa de siembra para inocularse en diferentes matraces de 125 ml con medio Basal de Bold, en las mismas condiciones de cultivo.

Una vez logrado el aislamiento las cepas se mantuvieron a luz constante (lámparas Philips de 38W) y temperatura de 25 °C para su siembra en los diferentes medios de cultivo para las pruebas.

### *Cultivo batch con MBB y MET*

Se evaluaron 18 tratamientos de cultivo batch en FBRs utilizando 2 medios de cultivo (MBB y MET) en 3 especies de microalgas (*Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp.), entre volúmenes de FBRs (1.5 L, 4.0 L y 9.0 L). El diseño utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3 x 3 y dos replicas (Cuadro 1):

Cuadro 1. Diseño experimental 2 x 3 x 3.

Medio de cultivo	Especie	Volumen del FBR (L)
Medio Basal de Bold (MBB)	<i>Scenedesmus</i> sp.	1.5, 4.0, 9.0
	<i>Monoraphidium</i> sp.	
	<i>Chlorella</i> sp.	
Medio de efluente de tilapia (MET)	<i>Scenedesmus</i> sp.	1.5, 4.0, 9.0
	<i>Monoraphidium</i> sp.	
	<i>Chlorella</i> sp.	

Los FBRs fueron de Tereftalato de polietileno (PET) de pared plana con forma cilíndrica y volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L. con dimensiones, diámetro/altura de 9.0/21.0, 14.5/22.0 y 19.5/29.0 cm, respectivamente. La iluminación se proporcionó con lámparas Philips de 38w, aireación de 1.6, 2.9 y 4.9 L min<sup>-1</sup> para los FBRs de 1.5, 4 y 9 L respectivamente y temperatura de 25 °C.

Para la obtención del medio de efluente tilapia se mantuvieron peces a una densidad de 20.0 kg m<sup>-3</sup> en peceras de 40.0 L de capacidad. La aireación y alimentación indicada para engorde (3 % de la biomasa según tabla de alimentación de purina) se proporcionó de manera constante durante 3 días. Posteriormente el efluente fue recolectado y filtrado para esterilizarse a ebullición (100 °C) en parrilla

durante 10 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y así se determinó la concentración inicial de fosfato y amonio para las pruebas. La concentración de fosfato y de amonio fue medida con un test para acuario (HAGEN ®) utilizando el método de ácido ascórbico modificado, con una sensibilidad mínima 5.0 mg L<sup>-1</sup>; y el método de salicilato con una sensibilidad mínima de 7.3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (según ficha técnica del fabricante HAGEN ®).

### ***Determinación de las constantes cinéticas***

La densidad celular se estimó diariamente durante 20 días mediante el conteo en cámara de Neubauer. La técnica de conteo se realizó tomando el número promedio de células presentes en los cuadrantes de cada cámara aplicando la ecuación 1.0:

$$\text{Densidad celular (células/mL)} \quad D_c = (\text{células})(10000)(Fd) \quad (\text{Ec. 1.0})$$

Donde  $D_c$  = densidad celular (cel/mL)

$Fd$  = factor de dilución

Para determinar el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento se emplearon las siguientes ecuaciones (Lee, 1992):

$$\text{Tiempo de duplicación (td)} \quad td = \ln 2 / \mu \quad (\text{Ec. 2.0})$$

$$\text{Velocidad específica de crecimiento}(\mu) \quad \mu = (\log C_1 - \log C_0) / (t_1 - t_0) \quad (\text{Ec. 3.0})$$

Donde  $C_0$  = concentración inicial (cel/ml) en la fase exponencial

$C_1$  = concentración final (cel/ml) en la fase exponencial

$t_0$  = tiempo inicial (días)

$t_1$  = tiempo final (días)

### ***Obtención de biomasa***

Después de 20 días de cultivo se obtuvo la biomasa mediante floculación con cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (Papazi *et al.*, 2010). Se hicieron tres lavados con solución salina fisiológica para la eliminación del compuesto floculante. Cuando se obtuvo la biomasa fue colocada en un papel filtro para eliminar el exceso de agua y poder determinar la producción en fresco ( $\text{g L}^{-1}$ ). Posteriormente la biomasa en fresco fue colocada en una termobalanza (marca; SHIMADSU, modelo; MOC-120H) para determinar el porcentaje de humedad. La producción en peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) (Ecuación 4.0) se obtuvo utilizando una balanza analítica marca Cítizen, modelo; CX220.

$$\text{Producción en seco (P}_s) \quad P_s = W_t/V \quad (\text{Ec. 4.0})$$

Donde  $P_s$  = producción en seco ( $\text{g L}^{-1}$ )

$W_t$  = peso total (g)

$V$  = volumen de cultivo (L)

Por otra parte se obtuvo la productividad en  $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  (Ecuación 5.0) según Griffiths & Harrison (2009); Li *et al.*, (2010) y Lim *et al.* (2010).

$$\text{Productividad (g L}^{-1}\text{ d}^{-1}) \quad Qv = \mu P_s \quad (\text{Ec. 5.0})$$

Donde  $P_s$  = Producción en seco ( $\text{g L}^{-1}$ )

La determinación de lípidos fue hecha por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado (Mandal y Mallick, 2009; Pahl *et al.*, 2010) utilizando un sistema de 2:1 metanol/cloroformo determinado gravimétricamente. La concentración de proteínas se obtuvo utilizando el método de Bradford (19769) (Stepanchenko *et al.* 2011). La cantidad de lípidos y proteínas se expreso como productividad de lípidos (QvL) y proteínas (QvP) (Griffiths y Harrison, 2009).

### *Análisis de datos*

Se utilizo el software estadístico SAS para los siguientes análisis:

ANDEVA factorial de dos vías para determinar la interacción y diferencia de medias entre el factor medio y especie de microalga en cada variable  $\mu$ , td, Qv, QvL Y QvP.

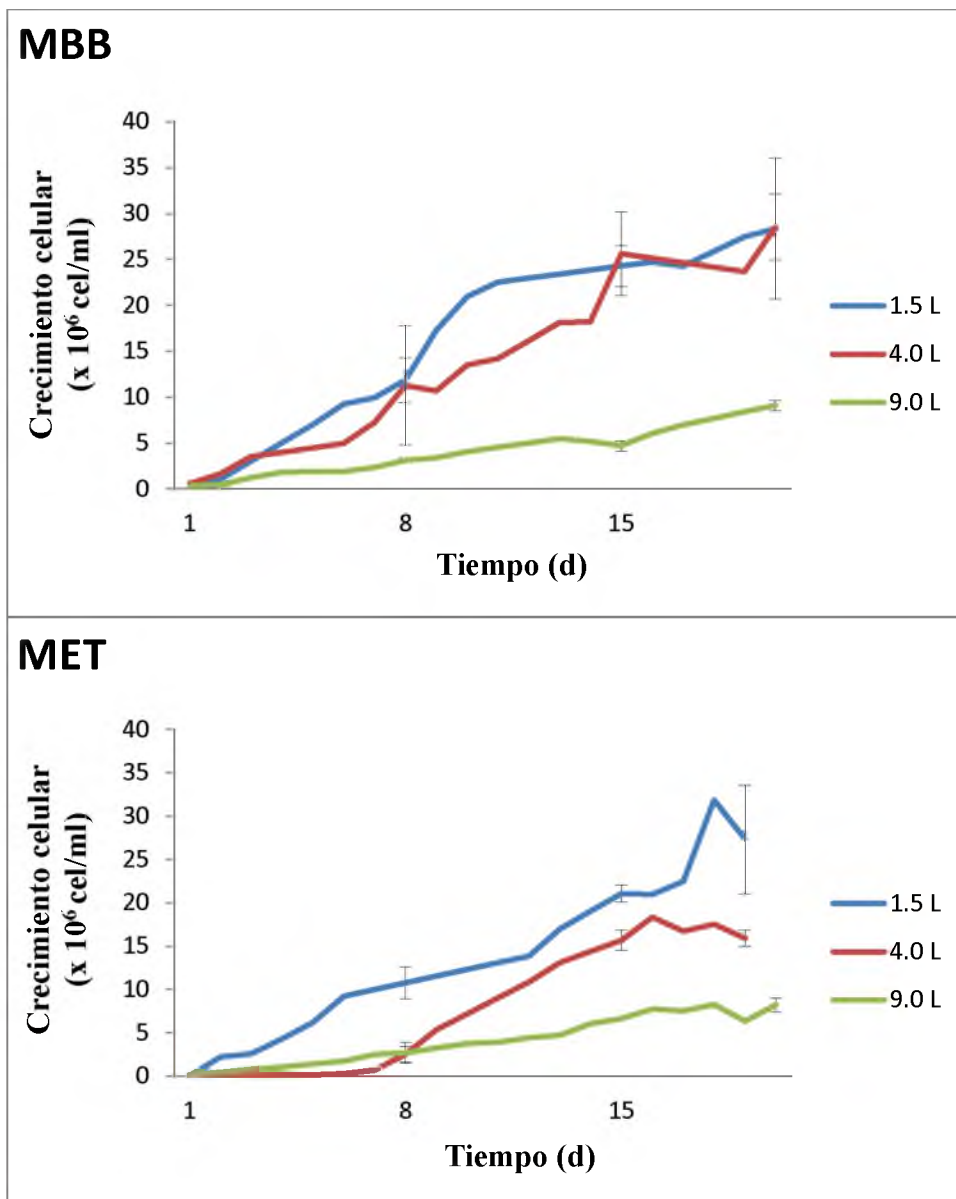
ANDEVA factorial de dos vías para determinar la interacción y diferencia de medias entre el factor volumen de FBR y especie de microalga en cada variable  $\mu$ , td, Qv, QvL Y QvP.

## RESULTADOS

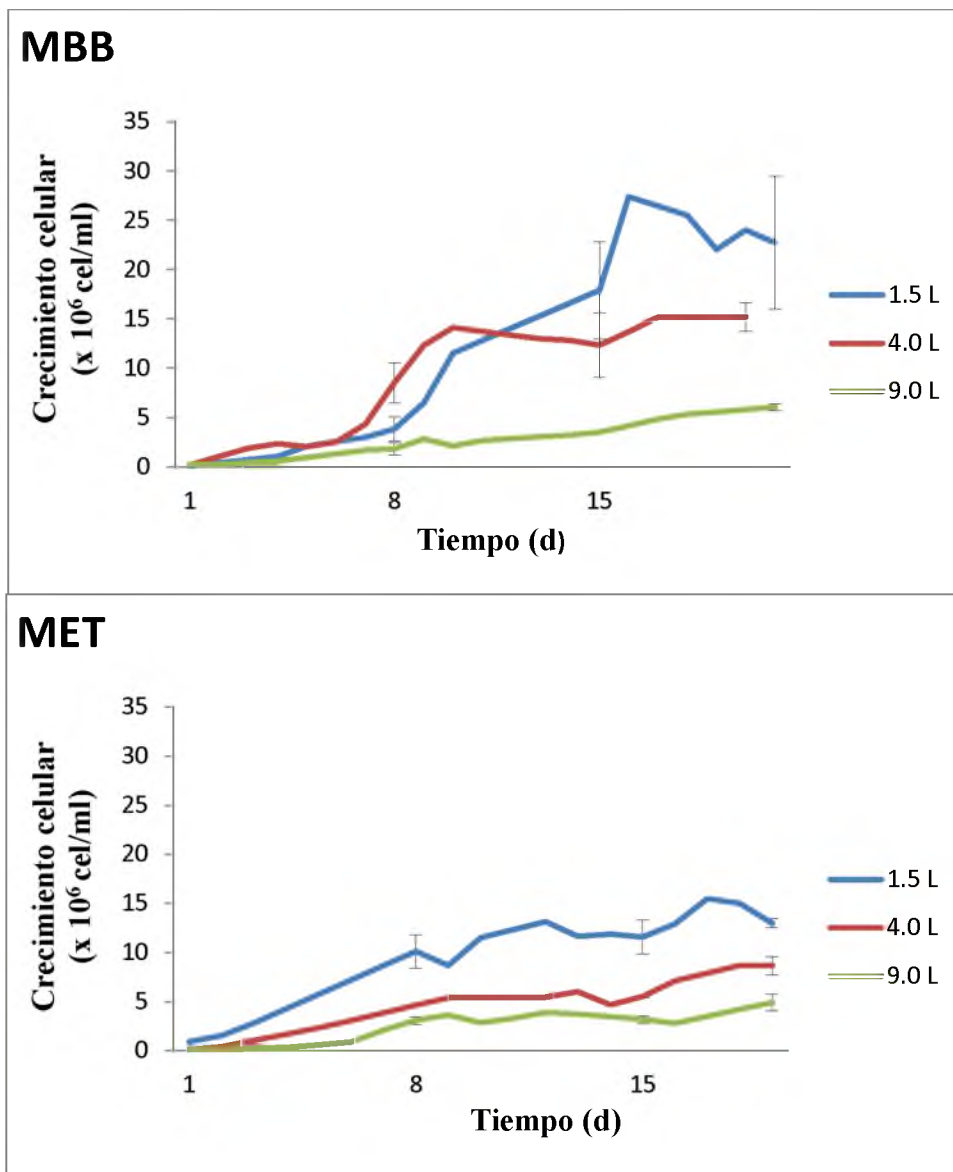
### *Cinéticas de crecimiento*

En las figuras 3, 4 y 5 se muestra las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Monoraphidium* sp. obtenidas con los tres tamaños de FBRs en ambos medios. En estas gráficas se describen en general un periodo de latencia de las microalgas en los primeros 3 días, seguido de un periodo de crecimiento donde se aprecian algunos descensos abruptos de la densidad celular.

Se pudo observar gráficamente la ausencia de una fase exponencial en la curva de crecimiento debido al efecto MET y del volumen del FBR. En cambio, solo se pudo observar típicamente una fase exponencial y una fase de desaceleración en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cuando fueron crecidas en MBB con FBRs de 1.5 y 4.0 L (Figura 3 y 4).



**Figura 3.** Cinética de crecimiento por densidad celular de *Chlorella* sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.



**Figura 4.** Cinética de crecimiento por densidad celular de *Scenedesmus* sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.

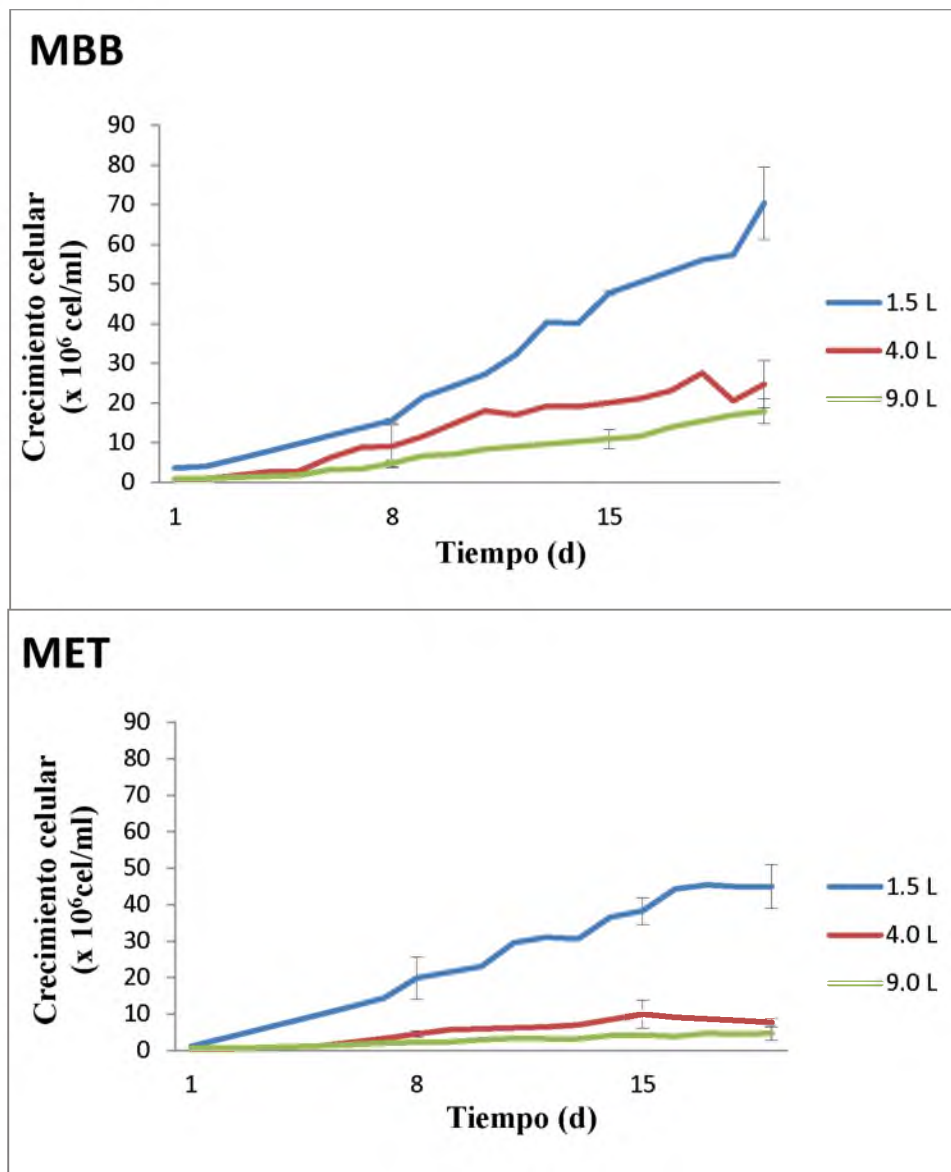


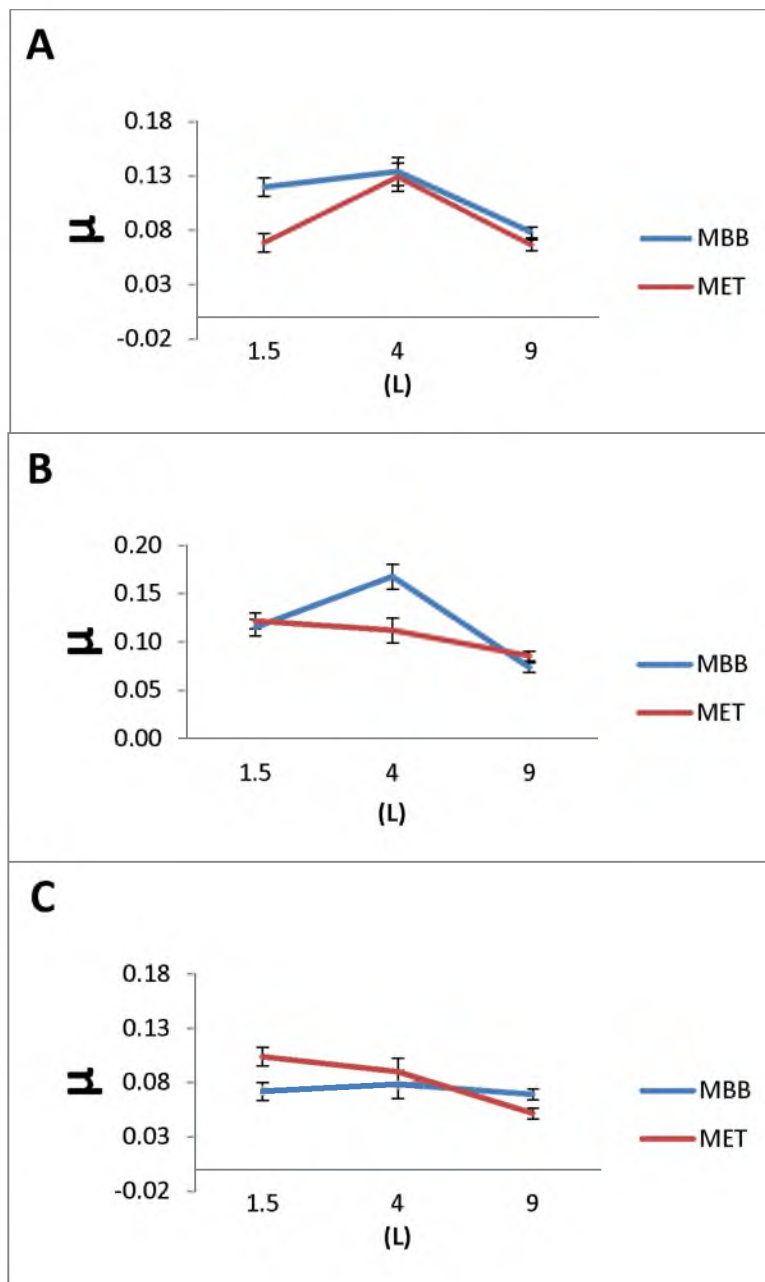
Figura 5. Cinética de crecimiento por densidad celular de *Monoraphidium* sp. usando FBRs con volúmenes de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L.

Los valores promedio de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) para las tres especies se muestran en el Cuadro 2; en esta se puede observar que utilizando el FBR de 1.5 L y MBB, *Chlorella* sp. (0.119) y *Scenedesmus* sp. (0.114) desarrollan una mayor  $\mu$  que *Monoraphidium* sp. (0.0171). En cambio solo *Scenedesmus* sp. se distingue con más ventaja sobre las otras en MET. En el caso de FBRs de 4.0 L *Monoraphidium* sp. (0.0896) presentó la menor  $\mu$  a comparación de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. que permanecen sin diferencias entre sí. Por otra parte en los FBRs de 9.0 L se conservó la tendencia de *Scenedesmus* sp. (0.0854) para desarrollar una mayor  $\mu$  con respecto a *Monoraphidium* sp. (0.0513), mientras que *Chlorella* sp. no difiere de las otras dos especies (Figura 6). Por otra parte se observó una relación inversamente proporcional entre la  $t_d$  y la  $\mu$  para todas las especies en ambos medios (Cuadro 2).

Cuadro 2. ANDEVA factorial alga-medio con las variables: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) en tres especies de microalgas cultivadas.

Volumen (L)/especie	$\mu$		$t_d$ (días)	
	MBB	MET	MBB	MET
1.5				
<i>Chlorella</i> sp.	0.119ab	0.068c	5.833b	10.191a
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.114a	0.121ab	6.078b	5.716b
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.071b	0.103c	9.702a	6.791b
ES	<b>0.0085</b>		<b>0.586</b>	
4.0				
<i>Chlorella</i> sp.	0.1339	0.1289	5.398	5.428
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.1677	0.1119	4.132	6.224
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.0782	0.0896	8.88	7.764
ES	<b>0.01289</b>		<b>0.587</b>	
9.0				
<i>Chlorella</i> sp.	0.0779	0.0661	8.929	10.501
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.0734	0.0854	9.442	8.113
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.0689	0.0513	10.048	14.051
SE	<b>0.0049</b>		<b>1.184</b>	

a, b, c: promedios en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) dentro de cada volumen y variables. Promedios dentro de la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ), ES: Error estándar de la interacción alga-medio. Donde no se encuentran letras, significa que no hay diferencia estadística. Donde no hay letras significa que no hay diferencia estadística.



**Figura 6.** Interacciones entre medios para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L. **A**, *Chlorella* sp , **B**, *Scenedesmus* sp , **C**, *Monoraphidium* sp.

### ***Productividad***

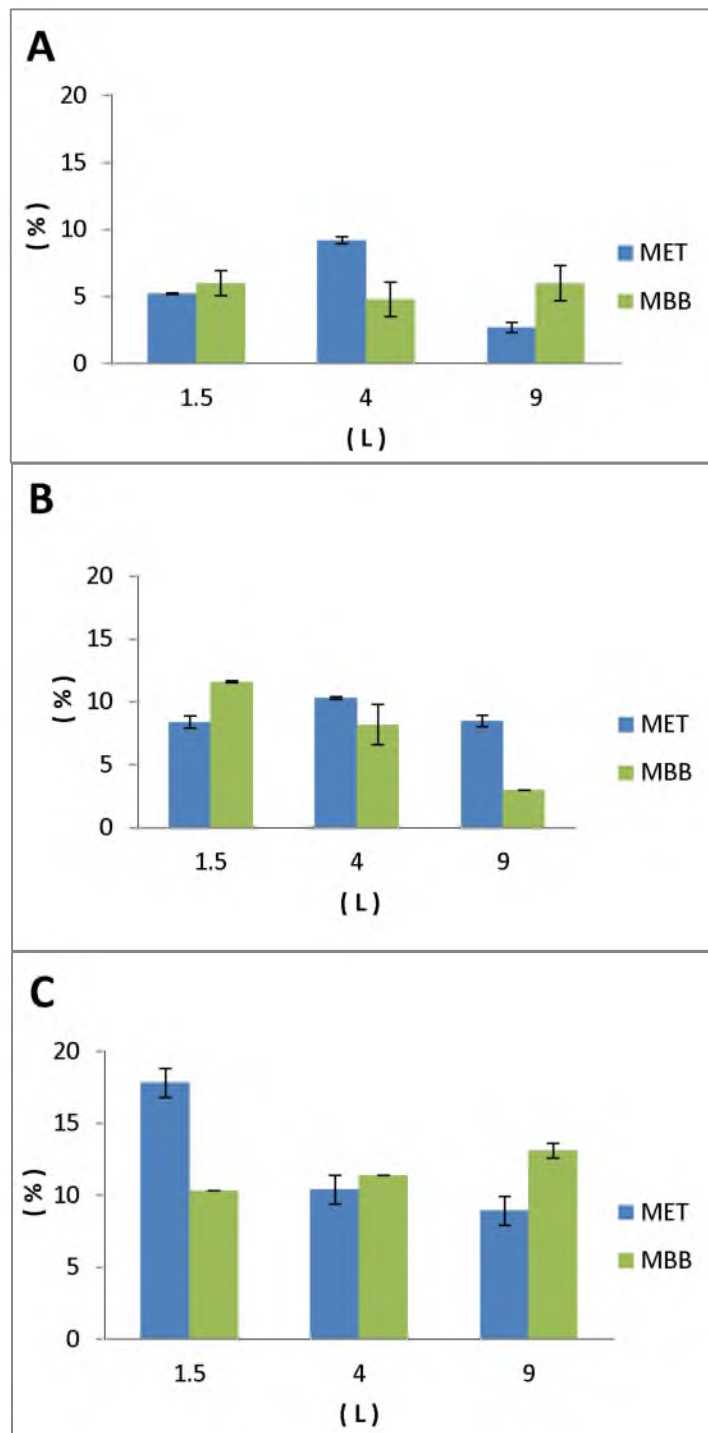
La biomasa seca obtenida en las pruebas con las diferentes condiciones de cultivo para las tres especies se expresó como productividad ( $Q_v$ ) (Cuadro 3). En este se puede apreciar que para los FBRs de 1.5 L en MET *Scenedesmus* sp. presentó una mayor  $Q_v$  ( $0.119 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) que las otras dos especies; en contraste para MBB, *Monoraphidium* sp. desarrolló la  $Q_v$  ( $0.034 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) más baja de las tres especies. Para los FBRs de 4.0 L en MET *Scenedesmus* sp. nuevamente presentó la mayor  $Q_v$  ( $0.038 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) de las tres especies, mientras que solo *Chlorella* sp. presentó la mayor  $Q_v$  ( $0.103 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) en MBB. Por otra parte se puede apreciar que en los FBRs de 9.0 L para ambos medios de cultivo, la productividad mayor la presentó *Chlorella* sp. seguida de *Scenedesmus* sp.

Cuadro 3. ANDEVA factorial alga-medio con las variables: productividad (Qv), productividad de lípidos (QvL), productividad de proteínas (QvP) en tres especies de microalgas cultivadas.

Volumen (L)/especie	Qv (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		QvL(g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		QvP(g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
	MBB	MET	MBB	MET	MBB	MET
1.5						
<i>Chlorella</i> sp.	0.152a	0.07bc	0.0094ab	0.0037b	0.0293	0.0165
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.119ab	0.153a	0.0139a	0.0129a	0.045	0.0614
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.034c	0.062bc	0.0035b	0.109a	0.0088	0.0287
ES	<b>0.017</b>		<b>0.0018</b>		<b>0.0089</b>	
4.0						
<i>Chlorella</i> sp.	0.103a	0.016d	0.005	0.0015	0.0249	0.0102
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.054b	0.038bc	0.0044	0.004	0.0205	0.0199
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.021cd	0.014d	0.0024	0.0015	0.0096	0.0065
ES	<b>0.005</b>		<b>0.0009</b>		<b>0.0037</b>	
9.0						
<i>Chlorella</i> sp.	0.023	0.028	0.0014a	0.0007ab	0.0068	0.0105
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.023	0.017	0.0007ab	0.0014a	0.0075	0.0037
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.011	0.005	0.0015a	0.0005b	0.0044	0.0019
ES	<b>0.002</b>		<b>0.00024</b>		<b>0.0014</b>	

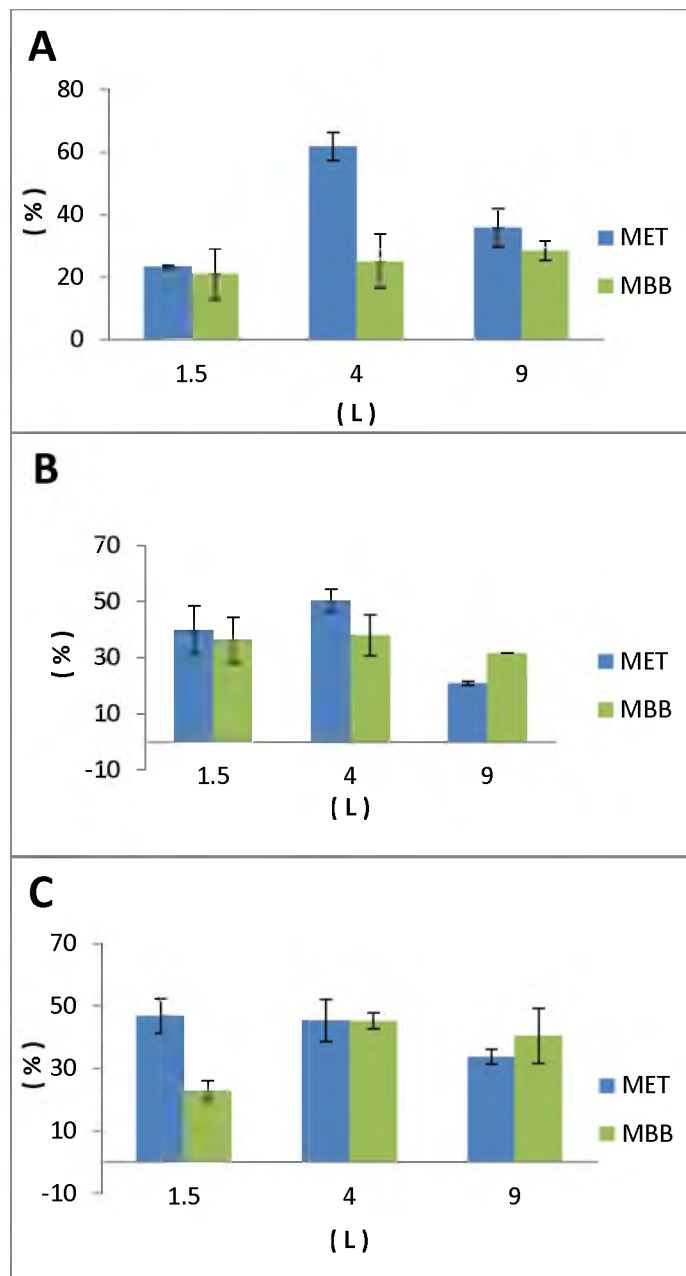
a, b, c: promedios en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0.05) dentro de cada volumen y variables. Promedios dentro de la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferente (P < 0.05), ES: Error estándar de la interacción alga-medio. Donde no se encuentran letras, significa que no hay diferencia estadística.

La producción de lípidos (%) de las tres especies en las diferentes condiciones de cultivo se puede observar en la figura 7 y se ven afectadas por los factores medio y volumen del FBR. Al obtener la productividad de lípidos (QvL) y el ANDEVA (Cuadro 3) se hace evidente que en el FBR de 1.5 L *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. presentaron una QvL (0.0139 y 0.0094 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> respectivamente) mayor que *Monoraphidium* sp. (0.0035 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) en MBB. Sin embargo, cuando son cultivadas en MET *Scenedesmus* sp. y *Monoraphidium* sp. presentan una QvL mayor que *Chlorella* sp. En el caso de los FBRs de 9.0 L *Chlorella* sp. y *Monoraphidium* sp. (0.0014 y 0.0015 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> respectivamente) desarrollaron mayor QvL que *Scenedesmus* sp. (0.0007 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) en MBB, mientras que en MET *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. se mantuvieron mayores. No hubo diferencias de QvL entre especies para los FBRs de 4.0 L en ambos medios.



**Figura 7.** Producción de lípidos en biomasa en medio de efluente de tilapia y medio Basal de Bold usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L. **A**, *Chlorella* sp, **B**, *Scenedesmus* sp, **C**, *Monoraphidium* sp.

En cuanto a porcentaje de proteínas (%), en la figura 8 se pudo apreciar que, de manera similar a la producción de lípidos, existe un efecto del volumen de FBR sobre la proporción de proteínas, aun que no es el mismo efecto para las tres especies. Al estimar la productividad de proteínas y al realizar el ANDEVA (Cuadro 2) se observa que en el FBR de 1.5 L *Scenedesmus* sp. presentó la mayor QvP (0.045 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en MBB y 0.0614 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en MET) de las tres especies en ambos medios, mientras que en los FBRs de 4.0 L *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. desarrollaron los mayores valores para QvP de igual manera para ambos medios. En el caso de los FBRs de 9.0 L solo *Chlorella* sp. se destaca en cualquier medio.



**Figura 8.** Producción de proteína en biomasa en medio de efluente de tilapia y medio Basal de Bold usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L. **A**, *Chlorella* sp , **B**, *Scenedesmus* sp , **C**, *Monoraphidium* sp.

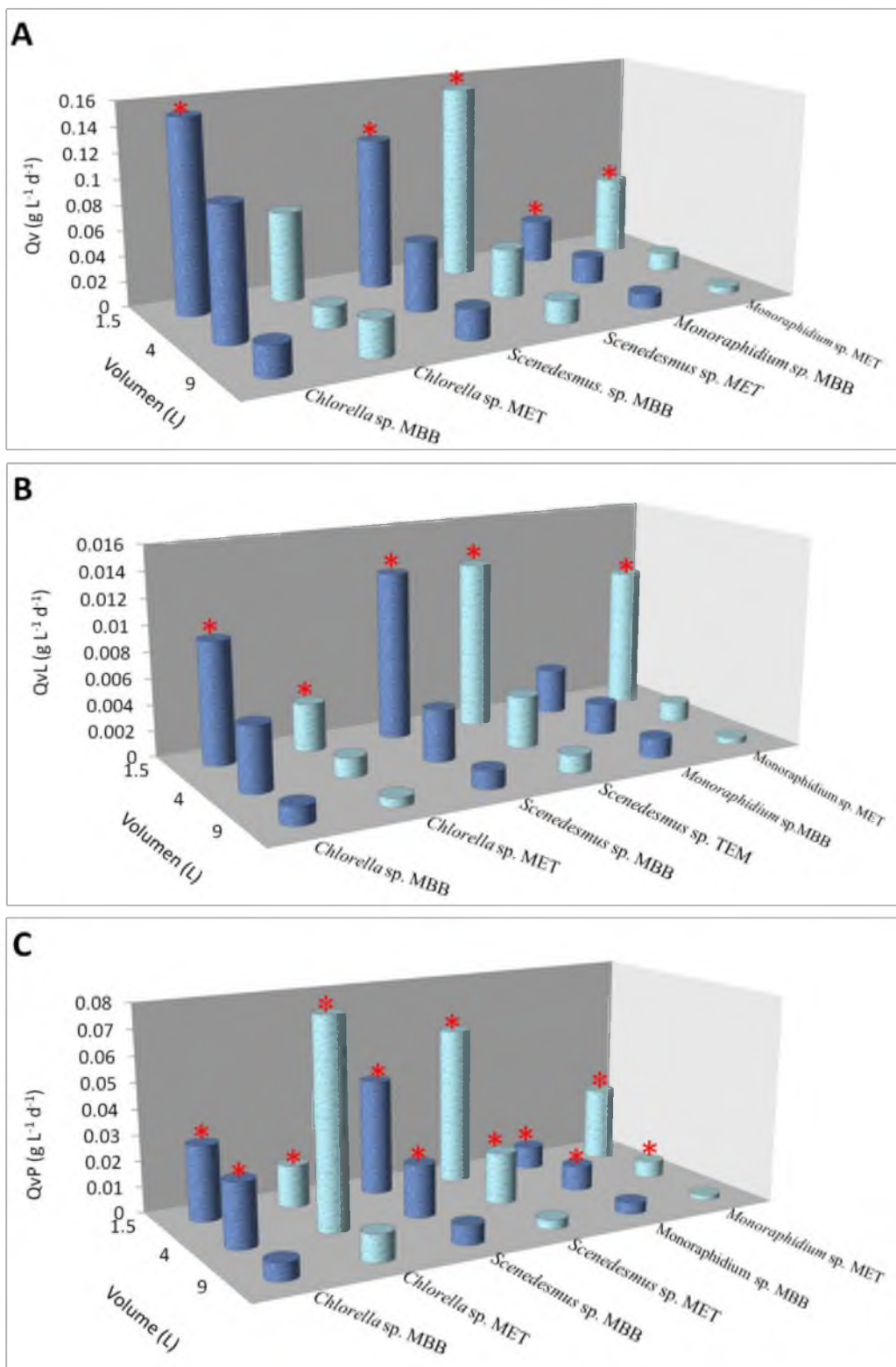
### *Optimización de Qv, QvL y QvP para cada especie*

Una optimización de las variables de respuesta Qv, QvL y QvP (Figura 9) se pudo obtener a partir de los análisis de varianza aplicados alga-medio (Cuadro 3) y alga-volumen (Cuadro 4) resultando de la siguiente manera:

Para *Chlorella* sp. la Qv ( $0.152 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) óptima fue alcanzada en los FBRs de 1.5 L en MBB; QvL ( $0.0094 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) estuvo en los FBRs de 1.5 L sin importar el medio y su QvP ( $0.0293$  y  $0.0249 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectivamente) se alcanzó en los FBRs de 1.5 y 4.0 L indistintamente del medio.

En el caso de *Scenedesmus* sp. la Qv y QvL óptimas estuvieron en los FBRs de 1.5 L y para QvP 1.5 y 4.0 L indistintamente del medio para todas las variables.

Por último para *Monoraphidium* sp. la Qv se optimizó en los FBRs de 1.5 L en cualquier medio; QvL ( $0.109 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) en los FBRs 1.5 L en MET y QvP en los FBRs de 1.5 y 4.0 L indistintamente del medio.



**Figura 9.** Optimización estadística de las variables de respuesta. **A**, productividad (Qv). **B**, productividad de lípidos (QvL). **C**, productividad de proteínas (QvP). El asterisco indica la condición óptima.

Cuadro 4. ANDEVA factorial alga-volumen con las variables: productividad (Qv), productividad de lipidos (QvL), productividad de proteínas (QvP) en tres especies de microalgas cultivadas.

Medio/Especie	Qv (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )			QvL (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )			QvP (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		
	1.5	4.0	9.0	1.5	4.0	9.0	1.5	4.0	9.0
<b>MBB</b>									
<i>Chlorella</i> sp.	0.1522a	0.1031b	0.0239c	0.0094	0.005	0.0014	0.0293	0.0249	0.0068
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.1194ab	0.0545c	0.0238c	0.0139	0.0044	0.0007	0.045	0.0205	0.0075
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.0345c	0.0214c	0.0114c	0.0035	0.0024	0.0015	0.0088	0.0096	0.0044
ES	<b>0.0143</b>			<b>0.0016</b>			<b>0.0063</b>		
<b>MET</b>									
<i>Chlorella</i> sp.	0.0708b	0.0169de	0.0289	0.0037c	0.0015d	0.0007d	0.0165	0.102	0.0105
<i>Scenedesmus</i> sp.	0.1534a	0.0389c	0.0179de	0.0129a	0.004c	0.0014d	0.0614	0.0199	0.0037
<i>Monoraphidium</i> sp.	0.0621b	0.0145e	0.0056e	0.009b	0.0015d	0.0005d	0.0287	0.0065	0.0019
ES	<b>0.0044</b>			<b>0.0003</b>			<b>0.0047</b>		

a, b, c, d, e: promedios en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0.05) dentro de cada especie y variables. Promedios dentro de la misma fila con diferente letra son estadísticamente diferente (P < 0.05), ES: Error estándar de la interacción alga-volumen. Donde no se encuentran letras, significa que no hay diferencia estadística.

### *Absorción de nutrientes*

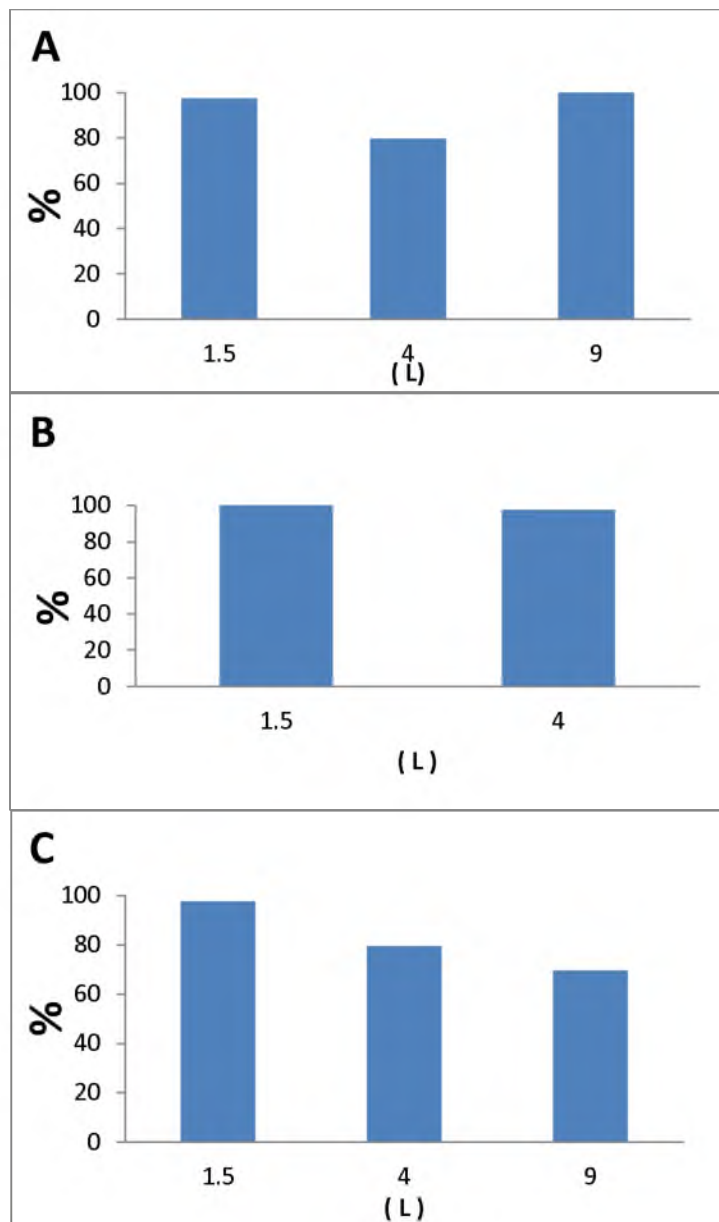
A partir de las características iniciales del MET (Cuadro 5) se pudo medir la absorción de nutrientes al final de los periodos de prueba. En la figura 10 se observó la concentración de nitrógeno en forma de amonio absorbida del medio MET para cada especie en los tres diferentes FBRs. Para los FBRs de 1.5 L la absorción es mayor del 90% para las tres especies. Mientras que en los FBRs de 4.0 L se observa un ligero descenso.

La remoción obtenida en este estudio en promedio para los tres FBRs en MET fue de 82.22% de amonio y 66.25% de fosfato para *Monoraphidium* sp.; 92.36% de amonio y 80% de fosfato para *Chlorella* sp.; 98.75% de amonio y 90% de fosfato para *Scenedesmus* sp.

Cuadro 5. Características del medio de efluente de tilapia usado para el cultivo de microalgas

Característica	Concentración
N-NH <sub>4</sub>	24 mg L <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub>	ND
NO <sub>2</sub>	ND
pH	7.5
PO <sub>4</sub>	10 mg L <sup>-1</sup>
Alcalinidad	80 mg L <sup>-1</sup>

ND: no detectado



**Figura 10.** Remoción de amonio en medio de efluente de tilapia usando FBRs de 1.5 L, 4.0 L y 9.0 L. A, *Chlorella* sp., B, *Scenedesmus* sp. (no se midió en 9 L) C, *Monoraphidium* sp.

## DISCUSION

Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se utilizó el modelo logístico clásico (Lee, 1992) donde lo que se obtiene es el incremento en la cantidad de células iniciales y finales en el tiempo considerado como la fase exponencial de crecimiento por medio de una aproximación lineal. Como se muestra en las figuras 3, 4 y 5 las trayectorias de las cinéticas de crecimiento en su mayoría no se comportan según este modelo logístico, atribuido a los efectos de los tratamientos con los factores medio y volumen de los FBRs. Así mismo la presencia de descensos abruptos en la fase de crecimiento de las curvas, se relacionan con errores experimentales de la medición de la densidad celular por conteo con cámara de Neubauer, la dilución de la muestra y la reproducibilidad (De Queiroz *et al.*, 2012).

Se han reportado métodos para aproximar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a la cinética de crecimiento principalmente cuando las características de los medios de efluente son tan variadas y se quiere establecer una relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con parámetros productivos en diferentes especies (Wu *et al.*, 2013; Guerreo-Cabrera *et al.*, 2014). En el presente trabajo debido a dichos errores de medición (principalmente conteo celular y dilución de la muestra), se tuvo que tomar de manera particular y gráficamente el intervalo de la curva de crecimiento que representara de manera más adecuada la cinética de crecimiento de cada especie.

Se esperaba que la  $\mu$  estuviera directamente relacionada con la productividad en cada especie, sin embargo, en *Monoraphidium* sp. en FBRs de 4.0 L y *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. en FBRs de 9.0 L, no se pudo observar una relación directa entre la  $\mu$  y la  $Q_v$  en ambos medios. Lo cual se puede atribuir nuevamente al método utilizado para el cálculo de la  $\mu$ .

Para el caso de *Chlorella* sp. en FBRs de 1.5 y 4.0 L hubo un efecto del medio sobre la productividad ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), siendo mayor con el MBB con respecto a el MET; esto último coincide con lo reportado por Borges *et al.* (2005) quienes demostraron que la productividad ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) de *Phaeodactylum tricorutum* Bholin obtenida con efluente parcialmente reciclado de cultivo intensivo de rodaballo, fue menor con respecto al medio de referencia que ellas utilizaron (medio f/2 Guillard Stein, 1979).

Se ha reportado que la productividad ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), tanto en fotobiorreactores de exterior o interior, se ve afectada directamente por la profundidad de los estanques o el diámetro de los tubos y contenedores respectivamente, debido al efecto de la profundidad óptica que permite la penetración de la luz en el medio para su aprovechamiento por la célula (Lee, 2001), dicha relación entre productividad y profundidad óptica, Grobbelaar (2008) y Wu *et al.* (2013) la describen como una función de tipo decaimiento exponencial de la productividad. En los resultados que se obtuvieron en este trabajo es claro el efecto del cambio de volumen del fotobiorreactor al aumentar el diámetro del contenedor, en la productividad (Figura 9). Al no haber variado la intensidad de luz durante los ensayos en los tres tamaños de FBRs, el efecto de la profundidad óptica en las tres especies y en ambos medios es claro. Además para cada condición de cultivo en cuanto a la dimensión de los fotobiorreactores, el manejo de un flujo de aireación constante es un factor adicional, que propiciaron un efecto negativo en la productividad volumétrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) al aumentar la dimensión del contenedor.

La variación interespecífica de las tres especies de microalgas estudiadas juega un papel importante en el aprovechamiento de compuestos orgánicos presentes en el medio. Siendo que Borges *et al.* (2005) observaron que en *Tetraselmis* sp. la producción de biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) fue tres veces mayor en medio de efluente de piscicultura en relación al medio de referencia Guillard f/2 (Stein 1979) en cultivos batch; mientras que en *Phaeodactylum tricorutum* (Bholin) el efecto fue contrario. En el caso del presente

trabajo *Chlorella* sp. presentó la mayor  $Q_v$  en MBB para los FBRs de 1.5 y 4.0 L en comparación a las otras dos especies.

Así mismo la productividad de lípidos ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) puede variar en cada especie microalgal de ambientes marinos y de agua dulce sometidas a condiciones de cultivo que inducen, la acumulación de estos compuestos y la proporción de ácidos grasos cualesquiera que sea su finalidad (Griffiths y Harrison, 2009); De las tres especies que se evaluaron solo *Monoraphidium* sp. mostró una mayor productividad de lípidos ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) en fotobiorreactores de 1.5 L con el MET, 49.8% mayor que el medio de referencia. A pesar de que *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. no presentaron diferencias en esta misma variable con respecto al medio de referencia; se esperaba que en general las tres especies evaluadas desarrollarían mayor productividad de lípidos en el MET independientemente del tamaño del fotobiorreactor; ya que la limitación de nitrógeno y fósforo y la presencia de compuestos orgánicos en el efluente de tilapia, son algunos de los factores que pueden inducir la acumulación de lípidos, además de cambiar la composición en cuanto a ácidos grasos se refiere (Ji *et al.*, 2010).

Utilizando medios formulados y diferentes grados de suplementación de glucosa en *Chlorella protothecoides*, obtuvieron un aumento en el contenido de lípidos de hasta un 55% en relación a un 15% obtenido en medio control de referencia; mientras que en *Chlorella vulgaris* se aumento a 40 % al limitar la concentración de nitratos (Mandal y Mallick, 2009). Existen otros trabajos donde se combinan estos dos factores (limitación de N:P ) para la inducción de acumulación de lípidos y fuentes de carbono en condiciones heterótrofas utilizando medios formulados (Qiao y wang, 2009). En el presente estudio, usando el FBR de 9.0 L para *Monoraphidium* sp. presentó una productividad de lípidos ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) mayor en el MBB de referencia que en el MET, donde existe una limitación de nitrógeno en forma de amonio 8 veces menor a la de nitratos en el MBB pero el nitrógeno y carbono

excretado por los peces vía heces fue una fuente alterna de nutrientes compensando la demanda de la microalgas.

En cuanto a la proporción de proteínas resalta el caso de *Chlorella* sp. en FBR de 4.0 L y *Monoraphidium* sp. en los FBRs de 1.5L donde el MET indujo una proporción significativamente mayor que el MBB; en contra parte la productividad de proteínas ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) ya no presentó diferencias entre ambos medios, lo cual está relacionado con la productividad total lograda en el medio de referencia. De manera general en las microalgas la alta velocidad de crecimiento y la alta proporción de proteínas que se puede producir con los medios formulados, está influenciada en gran manera con la alta concentración de nitrógeno comúnmente aportada en forma de nitratos (Fabregas *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 2000; Zhila, 2005; Ördög *et al.*, 2012); pero evidentemente las condiciones de cultivo, además de la relación N:P, pueden afectar en la productividad de proteínas aun en efluentes con altas concentraciones de amonio y fosforo como el efluente de producción porcina (Olguín, 2003). Sin embargo, el MET a pesar de mantener una concentración más baja de nitrógeno en forma de amonio con respecto a la de nitratos del MBB, proporcionó a la célula una forma de nitrógeno que puede ser más fácil de incorporar para la síntesis de proteínas (Chen *et al.*, 2009) contenida en las heces durante la excreción debido al alto contenido de proteína del alimento.

Las altas proporciones de proteínas por *Chlorella* sp. obtenidas en este estudio con el MET fueron de 40.33 % en comparación a *Chlorella minutissima*, (Ördög *et al.*, 2012) obtuvieron 50% con  $700 \text{ mg L}^{-1}$  de N como nitratos utilizando FBR de 20.0 L; esto confirma la gran capacidad de crecimiento de este género en ambientes mixotrofos con altas concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo como el de los efluentes municipales (Min *et al.*, 2011) y efluentes de piscicultura. Para las tres especies analizadas, la productividad de proteínas ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) obtenida en medio MET, refleja que el cambio de una condición fotoautotrofa a mixotrofica no afectó en general la productividad proteica, considerando

que no se aplicó una aclimatación previa de las cepas al MET antes de las pruebas. Esto lleva a pensar que la utilidad de MET para la productividad de proteínas podría llegar a sustituir el uso del medio formulado para producir biomasa como alimento.

La absorción de nitrógeno en forma de amonio que se registraron para las tres especies reafirma su facilidad de adaptación al MET. Aparentemente hubo una mejor absorción en este medio a comparación de la obtenida por Barrera *et al.* (2008); quienes observaron la dinámica de una comunidad microalgal de 30 especies en cultivo batch utilizando fotobiorreactores de 15.0 L a temperatura ambiente e iluminación natural. Ellos midieron la remoción de nitrógeno y fósforo de efluente municipal con 45 mg L<sup>-1</sup> de amonio inicial y 11 mg de fósforo total, en un ensayo de 25 días y encontraron una remoción del 61.4% de amonio y >65% de fosforo.

En un sistema combinado de cultivo alga-piscícola, Gál *et al.* (2007) evaluaron la absorción de nitrógeno y fósforo contenido en el efluente de estanques con 50 kg m<sup>-3</sup> de bagre africano (*Clarias gariepinus*) alimentados de manera intensiva y con la concentración de amonio del efluente que fue de 5.67 mg L<sup>-1</sup> y 2.38 mg L<sup>-1</sup> de fósforo. Ellos encontraron una remoción de nitrógeno de 57.1% y 77.3% de fósforo al combinar el cultivo microalgal en consorcio en estanques abiertos y en tanques de cultivo piscícola extensivo. En este trabajo la condición de cultivo en batch en interior con iluminación y aireación constante contribuyó a una mejor absorción de estos nutrientes en el MET. Además, la obtención del medio de efluente en condiciones controladas de laboratorio, puesto que los acuarios con peces permanecieron en ausencia de luz, y el uso de un efluente esterilizado jugaron un papel importante para la absorción directa por las especies microalgales de prueba.

En condiciones similares, Copertino *et al.* (2009) utilizando la microalga marina *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivada en efluente de camaronicultura observaron una remoción de amonio del 70-80% y 50% para fosfatos. Ellos manejaron cultivos alimentados y estáticos durante 12 días en tanques de 250 L a temperatura e iluminación ambiente. Borges *et al.* (2005) observaron también una remoción de amonio y fosfato del 73.6 al 99.1% y 20.5 al 99.3% respectivamente. Utilizando microalgas marinas como *Tetraselmis* en efluente de piscicultura con una concentración inicial de 4.7 mg L<sup>-1</sup> para amonio y 3.25 mg L<sup>-1</sup> de fosfato. Esta capacidad de absorción de amonio es observada también en los cultivos de tilapia en exterior y es muy común un alto desarrollo de fitoplancton debido a la rápida asimilación de nutrientes proveniente del pez. La productividad en estas condiciones podría ser optimizada en condiciones batch utilizando FBRs de 1.5 L y 4.0 L como se obtuvo en la optimización de las tres especies manejadas en el presente trabajo.

Sin embargo, debido al interés en biotecnología microalgal por obtener volúmenes de producción más altos, se recomienda se lleven a cabo estudios donde se busque optimizar el cultivo de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. con FBRs de mayor capacidad de 9.0 L en condiciones batch con el MET.

## CONCLUSIONES

Las curvas de crecimiento de las tres especies de microalgas en MET no se comportan conforme a la curva típica de crecimiento por no presentar una fase exponencial, lo cual se debe considerar cuando se haga el cálculo de la  $\mu$ .

Debido a que no hubo diferencia entre el MET y el MBB para la producción de biomasa, lípidos y proteínas. El efluente de piscicultura de tilapia es potencialmente útil para la producción de microalgas de agua dulce de los géneros *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en FBRs de 1.5 L y 4.0 L.

Las especies *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tienen una alta capacidad de absorción de amonio del efluente de piscicultura de tilapia. Por lo que son recomendables para su uso en el tratamiento de este tipo de efluentes.

De las tres especies que se aislaron *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. son las más aptas para producción de lípidos y proteínas. Por lo que podrían ser utilizadas para la producción de biocombustibles y alimentación de peces y camarones en sus primeras etapas del ciclo de vida.

## REFERENCIAS

1. Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P., Torres E., Herrero C., 1996. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de Coruña. España. 210 p.
2. Barrera B.C., Vázquez G., Barceló Q.I., Bussy A. L., 2008. Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water. *Water Air Soil Pollution* 190: 259–270.
3. Barsanti L., Gualtieri P., 2006. *Algae anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group. USA. 327p.
4. Borges M-T., Silva P., Moreira L., Soares R., 2005. Integration of consumer-targeted microalgal production with marine fish effluent biofiltration a strategy for mariculture sustainability. *Journal of Applied Phycology* 17: 187–197
5. Carta-Escobar F. Pereda-Marin J. Alvares M.P., Romero-Guzman F., Duran-Barrantes M.M., Barriga-Mateos., 2004. Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime. Part. 1: Análisis of the biodegradation process in two reactor configurations. *Biochemical Engineering Journal* 21(2): 183-191.
6. Chen, W., Zhang, Q., Dai, S., 2009. Effects of nitrate on intracellular nitrite and growth of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 21: 701–706.

7. Contreras F.C.I., Peña C. J. M., Flores C.L. B., Cañizares V.R.O., 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28: 450-456.
8. Copertino M. S., Tormena T., Seeliger U., 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *Journal of Applied Phycology* 21: 31-45.
9. De Queiroz J. C., de Melo F. A. C., Augusto D. A. C., 2012. The Growth of *monoraphidium* sp. and *scenedesmus* sp. cells in the presence of thorium. *The scientific world Journal* 2012: 8 pages.
10. Fábregas J., Patiño M., Vecino E., Cházaro F., Otero A., 1995. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied microbiology and biotechnology* 43: 617-621.
11. Gál, D., Pekár, F., Kerepeczki, É., Váradi, L., 2007. Experiments on the operation of a combined aquaculture-algae system. *Aquaculture International* 15: 173-180.
12. Griffiths M.J., Harrison S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21:493-507.
13. Grobbelaar. J.U., 2008 Upper limits of photosynthetic productivity and problems of scaling. *Journal of Applied Phycology* 21: 519-522.
14. Guerrero-Cabrera L., Rueda J. A., García-Lozano H., Navarro A. K., 2014. Cultivation of *monoraphidium* sp., *chlorella* sp., and *secenedesmus* sp., algae in batch culture using Nile tilapia effluent. *Bioresource technology* 161: 455-460.

15. Iturbide D.K., 2008. Caracterización de los efluentes de dos sistemas de producción de tilapia y el posible uso de plantas como agentes de biorremediación. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
16. Ji M-K., Kim, H.-C., Sapireddy, V.R., Yun, H.-S., Abo-Shanab, R.A.I., Choi, Lee, W., Timmes, T.C., Inamuddin, jeon, B.-H., 2013. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 2701-2710.
17. Lee J.M., 1992. *Biochemical Engineering*. Prentice Hall. New Jersey. 321 p.
18. Li X., Hu H-Y., Yang J., 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *N. Biotechnology* 27: 59–63.
19. Lim P-T, Leaw C-P., Kobiyama A, Ogata T. 2010. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Applied Phycology* 22: 203–210.
20. López S.J., Barrientos R.C., 2005. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 55 paginas.
21. Mandal S, Mallick N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84:281–291.
22. Min, M., Wang L., Li Y., Mohr M. J., Hu B., Zhou W., Chen P., Ruan R., 2011. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. *Applied Biochemical Biotechnology* 165: 123–137.

23. Mustafa E.-M., Phang S.-M., Chu W.-L., 2012. Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of Applied Phycology* 24:953–963.
24. Nichols H., Bold H., 1965. Growth media. In: JR S (ed) *Hand B. Physiol. Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 7–24
25. Ördög, V., Stirk, W.A. Bálint, P., Staden, J.V. Lovász, C., 2004. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology* 24: 907-914.
26. Pacheco V.J.M., Cadena R.M.A., Sánchez S.M.P., Tovar R.D., Rangel D.C., 2010. Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1(1): 6-15.
27. Pahl S.L., Lewis D.M., Chen F., King K.D., 2010. Growth dynamics and the proximate biochemical composition and fatty acid profile of the heterotrophically grown diatom *Cyclotella cryptica*. *Journal of Applied Phycology* 22:165–171.
28. Papazi A., Makridis P., Divanach P., 2010. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology* 22:349–355.
29. Qiao H., Wang G., 2009. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. *Chinese Journal of oceanology and limnology* 27 (4): 762-768.
30. Olguin E. J., Galicia S., Mercado G., Pérez T., 2013. Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology* 15: 249-257.

31. Sánchez S., Martínez M. E., Espinola F., 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isorichrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering journal* 6: 13-18.
32. Sigeo D.C., 2005. *Freshwater Microbiology. Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons Ltd. England. 544 p.
33. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87–96.
34. Stepanchenko N.S., Novikova G.V., Moshkov I.E., 2011. Protein quantification. *Russ. J. Plant Physiol.* 58:737–742.
35. Vairappan S. C., Yen M. A., 2008. Palm oil mill effluent (POME) cultured marine microalgae as supplementary diet for rotifer culture. *Journal of Applied Phycology* 20: 603 – 608.
36. Wu Y.-H., Li X., Yu Y., Hu H.-Y., Zhang T.-Y., Li, F.-M., 2013. An integrated microalgal growth model and its application to optimize the biomass production of *Scenedesmus* sp. LX1 in open pond under the nutrient level of domestic secondary effluent. *Bioresource Technology* 144: 445–451.
37. Wikfors G. H., 2001. Impact of algal research in aquaculture. *Journal Phycology* 968-974.
38. Zhila N. O., Kalacheva G. S., Volova T. G., 2005. Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii*. *Russian Journal of Plant Physiology* 52 (3): 311-319.