

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

Cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum* en agua
proveniente del cultivo de *Litopenaeus vannamei* para la
remoción de compuestos nitrogenados y fosfatos

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Pedro Alejandro Vásquez Gallegos

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Pedro Alejandro Vásquez Gallegos

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Misael Rosales Leija
Codirector de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. Elizabeth Ponce Rivas



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Ciencias en
Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Pedro Alejandro Vásquez Gallegos** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum* en agua proveniente del cultivo de *Litopenaeus vannamei* para la remoción de compuestos nitrogenados y fosfatos

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Misael Rosales Leija
Codirector de tesis

Para minimizar los impactos generados por los efluentes de la camaronicultura, se destaca la implementación de cultivos accesorios como las microalgas. Estas, pueden aprovechar los nutrientes de los efluentes produciendo un efecto de biorremediación y, a su vez, generar compuestos de interés; en este sentido, se evaluó la eficiencia de remoción de nutrientes y la biomasa producida por la microalga *Porphyridium cruentum* cultivada en concentraciones de 75% y 100% de agua del efluente proveniente del cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para dicho efecto, se definieron tres tratamientos con tres réplicas, un tratamiento control con medio "f/2" y los tratamientos con efluente C75 (75%) y C100 (100%). Se aplicó ANOVA para evaluar la biomasa celular, el pigmento ficoeritrina, el exopolisacárido sulfatado (EPS) y la remoción de nutrientes. La densidad celular promedio fue de 2.79×10^6 cél ml⁻¹. Al final del cultivo, se observó un peso seco total (PST) promedio de 881 µg ml⁻¹ y 322 pg cél⁻¹, y un peso orgánico (PO) promedio de 387 µg ml⁻¹ y 141 pg cél⁻¹. El mayor contenido de ficoeritrina fue en los cultivos con el medio "f/2" (14.1 µg ml⁻¹ y 12 pg cél), además, se observó una producción promedio de EPS por encima de 3 mg ml⁻¹. Con respecto a la eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT), se encontró que los tratamientos C100 y C75 (con 72% y 73% de remoción, respectivamente) tuvieron una mayor ($p < 0.05$) remoción que "f/2", con la concentración más alta de este nutriente en C100 (0.06 mg L⁻¹) ($p < 0.05$). Con respecto a la remoción de nitratos, el medio "f/2" removió hasta un 94%, mientras que los tratamientos C75 y C100 removieron un 88% y 87%, respectivamente. Con respecto a los nitritos, la remoción fue del 100% en el tratamiento "f/2" y del 54% y 36% en los tratamientos C75 y C100 respectivamente, encontrándose una concentración significativamente mayor en C75 y C100 (0.39 mg L⁻¹ en promedio). La eficiencia de remoción de fosfatos fue del 100% en todos los tratamientos. Por lo que *P. cruentum* es adecuada para biorremediar los efluentes provenientes del cultivo de camarón.

Palabras clave: Microalgas, *Porphyridium cruentum*, efluentes acuícolas, biorremediación

Abstract of the thesis presented by **Pedro Alejandro Vásquez Gallegos** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Culture of the microalgae *Porphyridium cruentum* in water from the culture of *Litopenaeus vannamei* for the removal of nitrogenous compounds and phosphates

Abstract approved by:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector of thesis

Dr. Misael Rosales Leija
Codirector of thesis

To minimize the impacts generated by shrimp farming effluents, the implementation of accessory crops such as microalgae stands out. These can utilize the nutrients in the effluents, producing a bioremediation effect and, in turn, generating compounds of interest; In this sense, the efficiency of nutrient removal and the biomass produced by the microalga *Porphyridium cruentum* cultivated in concentrations of 75% and 100% of the effluent from the culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei* were evaluated. For this purpose, three treatments with three replicates were defined, a control treatment with "f/2" media (f/2) and the treatments with effluent C75 (75%) and C100 (100%). ANOVA was applied to evaluate cell biomass, exopolysaccharide (EPS), phycoerythrin, and nutrient removal, was performed by a one-way ANOVA. The mean biomass obtained from *P. cruentum* was 2.79×10^6 cells ml⁻¹ on day 10 of the culture. At the end of the culture, an average total dry weight (TDW) of 881 µg ml⁻¹ and 322 pg cell⁻¹ was observed, and an average organic weight (OW) of 387 µg ml⁻¹ and 141 pg cell⁻¹. The highest content of phycoerythrin was in the cultures with the "f/2" medium (14.1 µg ml⁻¹ and 12 pg cell⁻¹), in addition, an average EPS production above 3 mg ml⁻¹ was observed. Regarding the removal efficiency of total ammonia nitrogen (TAN), it was found that the C100 and C75 treatments (with 72% and 73% removal, respectively) had a higher ($p < 0.05$) nutrient removal than "f/2", with the higher concentration of TAN found in C100 (0.06 mg L⁻¹). Regarding the removal of nitrates, the "f/2" media removed up to 94%, while the C75 and C100 treatments removed 88% and 87%, respectively. Regarding nitrites, the removal was 100% in the "f/2" treatment and 54% and 36% in the C75 and C100 treatments, respectively, finding a significantly higher concentration in C75 and C100 (0.39 mg L⁻¹ on average). The phosphate removal efficiency was 100% in all treatments. Therefore, *P. cruentum* is suitable bioremediation of effluents from shrimp farming.

Keywords: Microalgae, *Porphyridium cruentum*, aquaculture wastewaters, bioremediation

Dedicatoria

A Carmen, por acompañarme y apoyarme cuando nadie más lo hizo, por tu amor incondicional y creer en mí, te amo.

A mis padres, por enseñarme lo que es la perseverancia y por forjar la persona que hoy soy.

A mis mejores amigos Isain, Daniel y Cristian, por creer en mí y hacerme reír cuando lo necesitaba.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su apoyo económico para la culminación de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por brindarme la oportunidad de formar parte de la institución estudiantil y por su apoyo en mi formación académica como Maestro en Ciencias en Acuicultura.

A mis Directores de tesis, Dra. Beatriz Cordero Esquivel y Dr. Misael Rosales Leija, por darme la oportunidad de formar parte de sus estudiantes, por su guía, el valioso conocimiento compartido conmigo, por su tiempo y paciencia, son un ejemplo a seguir. Por permitirme trabajar en el cultivo de microalgas y el efluente del cultivo de camarón del CICESE. Muchas gracias.

A mis sinodales, Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por sus valiosos consejos, sugerencias y orientación profesional para la culminación de este trabajo.

A los técnicos Abelardo Campos y Francisco Mar por su guía y apoyo durante mi formación.

A los académicos y empleados del Departamento de Acuicultura por compartir sus conocimientos durante mi formación.

A mis compañeros y cómplices Damián Hernández y Rubén Luna, por su apoyo, anécdotas, por brindarme su amistad y colaboraron con la culminación de este trabajo.

A Ludsmila por su apoyo moral y consejos.

A mi prometida Carmen, por apoyarme y darme las fuerzas para seguir hasta el final.

GRACIAS TOTALES

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Justificación.....	7
1.2 Hipótesis	7
1.3 Objetivos.....	8
1.3.1 Objetivo general	8
1.3.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Cultivo y mantenimiento de <i>Porphyridium cruentum</i>	9
2.2 Sistema de cultivo de <i>L. vannamei</i>	9
2.3 Diseño experimental.....	9
2.4 Evaluación de la biomasa producida.	10
2.4.1 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)	11
2.4.2 Análisis de ficoeritrina.....	13
2.4.3 Análisis de la composición del exopolisacárido sulfatado (EPS)	14
2.5 Evaluación de nutrientes	14
2.5.1 Nitrógeno amoniacal total (NAT)	15
2.5.2 Nitratos (NO_3^-).....	15
2.5.3 Nitritos (NO_2^-).....	15
2.5.4 Fosfatos (PO_4^{3-}).....	15
2.6 Análisis estadístico y procesamiento de datos	16
Capítulo 3. Resultados	17
3.1 Biomasa.....	17

3.1.1	Peso seco total (PST) y orgánico (PO)	18
3.1.2	Ficoeritrina	21
3.1.3	Exopolisacárido (EPS)	23
3.2	Nutrientes	24
3.2.1	Nitrógeno amoniacal total (NAT)	25
3.2.2	Nitratos (NO_3^-)	26
3.2.3	Nitritos (NO_2^-)	28
3.2.4	Fosfatos (PO_4^{3-})	30
Capítulo 4.	Discusión	32
Capítulo 5.	Conclusiones	40
Literatura citada		41
Anexos		49

Lista de figuras

Figura	Página
1. Biomasa (cél ml ⁻¹ x 10 ³) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada con tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar.	17
2. Peso seco total (PST) (µg ml ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, a<b. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.....	19
3. Peso seco total (PST) (pg cél ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.....	19
4. Peso seco orgánico (PO) (µg ml ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.	20
5. Peso seco orgánico (PO) (pg cél ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.....	21
6. Concentración de ficoeritrina (µg ml ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, a<b. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.....	22
7. Contenido promedio de ficoeritrina (pg cél ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, a<b. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C.....	23
8. Producción de exopolisacárido sulfatado (EPS, mg ml ⁻¹) por <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras	

- corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B$ 24
9. Concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT, mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D < E$ 25
 10. Concentración de nitratos (NO_3^- , mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D < E$ 27
 11. Concentración de nitritos (NO_2^- , mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D$ 29
 12. Concentración promedio de fosfatos (mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D$ 31
 13. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95 % del peso total (PST) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo. 49
 14. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso total (PST) en pg cél^{-1} de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo. 49
 15. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso orgánico (PO) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo. 50
 16. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso orgánico (PO) en pg cél^{-1} de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo. 50
 17. Comparación y dinámica simplificada del nitrógeno amoniacal total (NAT), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y fosfatos (PO_4^{3-}) en el cultivo de *Porphyridium cruentum*. 51

18. Comparación y comportamiento de la concentración estimada de nitrógeno residual (N) y la concentración de ficoeritrina de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo 51

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Posición taxonómica de <i>Porphyridium cruentum</i> (ITIS, 1996).	5
2. Tasa de crecimiento (μ : divisiones día ⁻¹) de <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Valores de la tasa de crecimiento (μ) arriba de 0.5 se considera fase exponencial.	18
3. Características del efluente del cultivo de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
4. Eficiencia de remoción por día de nitrógeno amoniacal total (NAT, %) por <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).	26
5. Eficiencia de remoción de nitratos (NO ₃ ⁻ , %) por <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).28	
6. Eficiencia de remoción de nitritos (NO ₂ ⁻ , %) por <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).30	
7. Eficiencia de remoción de fosfatos (PO ₄ ³⁻ , %) por <i>Porphyridium cruentum</i> cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).31	

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura es una industria que aporta a la seguridad alimentaria y a la reducción de la pobreza (Welcomme y Barg, 1999). En el último siglo se ha registrado un crecimiento de producción nunca visto, a tal grado que ahora contribuye con más de la mitad de los alimentos acuáticos consumidos a nivel mundial. De hecho, se predice que, para antes de 2030, más del 65% de estos alimentos podrían provenir de la acuicultura (González-Henríquez *et al.*, 2015)

En el año 2020, el cultivo de organismos acuáticos estuvo dominado por peces de aleta provenientes de la acuicultura (57.5 millones de toneladas), seguido por la producción de moluscos (17.7 millones de toneladas), crustáceos (11.2 millones de toneladas), invertebrados marinos (525,000 toneladas), y otros animales acuáticos. Respecto al cultivo de algas marinas, predominan las macroalgas, en el 2020 la producción se vio incrementada en 1.4 % comparando con el 2019, esto corresponde a medio millón de toneladas lo que da un total de 35.1 millones de toneladas para el 2020 (FAO, 2022). En el caso de las microalgas, un censo realizado en 20 países reveló que el cultivo aún no se incluye en los sistemas nacionales para la recopilación y notificación de la acuicultura (FAO, 2020). Por otro lado, el cultivo suele ser extremadamente regulado y supervisado, siendo excluido o tratado por separado de la acuicultura; aun así, la FAO ha registrado una producción de 87,000 toneladas de microalgas, siendo *Chlorella* spp., *Haematococcus pluvialis* y *Nannochloropsis* spp. las principales especies cultivadas en el 2018 (FAO, 2020).

En México, la acuicultura es encabezada por organismos como la tilapia, cultivada en agua dulce y el camarón en agua salada (Miranda Baeza *et al.*, 2011). En los años 70's, la camaronicultura vio sus inicios en México (Dewalt *et al.*, 2002), ubicándose al noroeste del país, la gran mayoría de las granjas dedicadas a este cultivo. Nuestro país posee ventajas que lo han llevado a convertirse, a nivel mundial, en uno de los principales países productores de camarón provenientes de la acuicultura; entre las principales ventajas se pueden destacar las siguientes: extensas costas aprovechables para la acuicultura, diversidad de climas favorables para diversas especies, cercanía al mercado y especies nativas de valor comercial, como el camarón blanco y azul (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

En términos generales existen tres tipos de sistemas empleados en el cultivo del camarón, el primero y más comúnmente empleado es el sistema extensivo, el cual consiste en el cultivo de organismos a bajas densidades y donde se emplea un escaso manejo de las condiciones de cultivo; por otra parte, el segundo sistema utilizado es el semi-intensivo, que emplea densidades de siembra más altas comparadas con el

extensivo, en el cultivo se suele usar estanquería, cajas o tanques y el manejo de factores que afectan el cultivo es moderado; por último, en los sistemas intensivos se cultivan organismos en altas densidades de siembra y los diversos factores que intervienen en los cultivos son altamente controlados (Bortolini-Rosales y García, 2004).

Son varias las especies de camarón que se pueden encontrar en México, siete de ellas tienen potencial de cultivo: 4 son del género *Farfantepenaeus* y 3 del género *Litopenaeus*, dentro del que destaca el camarón blanco (*L. vannamei*), el cual se obtiene tanto de la pesca como de cultivos en granjas (Arredondo-Figueroa, 2002; DMplast, 2023), esta especie se encuentra en el océano Pacífico oriental, específicamente desde el Golfo de California hasta las costas del Perú (Fox, 2007), se adapta fácilmente al cultivo, soporta altas densidades y diferentes condiciones ambientales, además, tiene supervivencias altas y un buen valor comercial a nivel internacional.

Se considera que del 100% del camarón cultivado, el 52% proviene del sector privado y el 48% restante de sociedades cooperativas, en este último se utilizan cultivos pequeños con volúmenes variables en los ciclos de cultivo y se tiene poco control sobre los factores que intervienen en su cultivo; aunque mantener un bajo control permite una reducción de los costos de cultivo, la producción de camarón cultivado con estas características puede llegar a generar problemas en la sostenibilidad de la camaronicultura, ya que se han identificado efectos ambientales adversos a nivel local regional y mundial.

El impacto social y la sostenibilidad del cultivo de camarón ha sido discutido por diferentes autores, las ganancias generadas por este sector han promovido un rápido crecimiento de la actividad, junto con la posibilidad de nuevos empleos y una reducción de la presión sobre los stocks naturales. Para que el cultivo sea sostenible a largo plazo, será necesario que la industria realice una buena gestión sobre los ecosistemas y sus recursos, con el fin de minimizar los impactos ambientales; de igual forma, una gestión adecuada genera impactos sociales que repercuten en el gobierno, permitiendo desarrollar políticas para regular su desarrollo (Dewalt *et al.*, 2002).

Tal vez uno de los principales problemas que la acuicultura enfrenta en estos momentos, es la generación de desechos, ya que un gran número de partículas (sedimentables y disueltas) y compuestos químicos son liberados al ambiente provocando zonas anóxicas, eutrofización y florecimientos de algas (González-Henríquez *et al.*, 2015). Estos efluentes de aguas residuales contienen compuestos nitrogenados, fósforo y carbono orgánico en concentraciones altas que, si no son tratados, alteran el equilibrio de los ecosistemas y pueden conducir a una mortalidad masiva de organismos acuáticos (Lananan *et al.*, 2014).

Si bien en México el impacto negativo de la camaronicultura no es tan evidente como en otros países, este no deja de ser un problema que afecta principalmente la calidad del agua (Agraz-Hernández, 1999; Bortolini-Rosales y García, 2004), y se ha documentado que el amoníaco es el elemento más tóxico y el más importante a tratar en los efluentes de la camaronicultura (Iber y Kasan, 2021).

El alimento para el cultivo de camarón en engorda posee entre el 30% y 40% de proteína, sin embargo, alrededor del 75 al 80% del alimento suministrado termina como desecho orgánico en el fondo de los estanques, lo que puede generar hasta 50 g de nitrógeno amoniacal por Kg de alimento consumido, a esto se le suman los organismos muertos y las heces que también generan compuestos que permanecen en el agua (Iber y Kasan, 2021). El nitrógeno amoniacal resultante es transformado en nitritos y posteriormente en nitratos por bacterias quimioautótrofas (ej. *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp., respectivamente), estos pueden ser aprovechados en la naturaleza por plantas acuáticas, algas y bacterias, lo cual no ocurre en los cultivos controlados de organismos acuáticos (Meril *et al.*, 2022).

Se han empleado diferentes métodos por reducir la concentración de nutrientes en efluentes acuícolas, entre ellos los de la camaronicultura (Iber y Kasan, 2021). El tratamiento de estas aguas puede ser dividido en dos tipos: biorremediación *in situ* y biorremediación *ex situ*; el primero hace referencia al tratamiento de las aguas durante el cultivo y en el mismo estanque, y el segundo es el tratamiento del agua extraída de la zona contaminada, fuera de la zona donde el efluente fue generado (Iber y Kasan, 2021; Ni *et al.*, 2021). Gouma *et al.* (2014), definen la biorremediación como la capacidad que tienen los microorganismos, plantas y hongos para eliminar compuestos tóxicos de medios y sustratos contaminados de manera parcial o en algunos casos total.

Por mencionar algunas ideas para tratar los efluentes acuícolas, Lananan *et al.* (2014) proponen la biorremediación como una opción para remoción de nitrógeno amoniacal y fósforo de aguas residuales acuícolas, estos autores utilizaron un sistema simbiótico entre bacterias y la microalga *Chlorella* sp. en el efluente del cultivo de *Lates calcarifer* (barramundi, pez típico de Australia) y obtuvieron una eficiencia de remoción del 99.15% de fósforo y más del 90% de amoníaco. Kishi *et al.* (2018), en un trabajo similar, utilizaron un sistema de estanque de alto rendimiento algal (sistema simbiótico algas-bacterias), donde simulaban las características de aguas de un efluente acuícola, y lograron cerca del 100% de eficiencia de remoción de los nutrientes en el agua.

En trabajos relacionados con la biorremediación en efluentes del cultivo de camarón, Lezama-Cervantes *et al.* (2010), emplearon tapetes microbianos con sistema de recirculación para tratar efluentes

provenientes del cultivo de *L. vannamei* y con este sistema lograron reducir más del 71% del nitrógeno amoniacal total y 62% de sólidos suspendidos, además obtuvieron efectos positivos en la supervivencia y crecimiento del camarón. Por otro lado, Meril *et al.* (2022), trabajaron con 18 cepas de microalgas inmovilizadas con perlas de alginato para tratar aguas de efluente del cultivo de camarón. Los resultados mostraron una mayor capacidad de remoción de nutrientes al utilizar *Picochlorum maculatum*, *Chlorella marina* y *Tetraselmis suecica* (por encima del 90%).

Bajo este contexto, se pueden observar las ventajas de la biorremediación y su capacidad para resolver varios problemas a la vez (Meril *et al.*, 2022), mientras que la búsqueda de sistemas sostenibles de bajo costo hace de la ficorremediación una alternativa atractiva. Olguín y Sánchez-Galván (2012) definen la ficorremediación como “*el uso de macroalgas, microalgas y cianobacterias para la eliminación o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes y xenobióticos de aguas residuales y el CO₂ del aire residual*”. En este sentido, las microalgas adquieren una gran relevancia, pues son reconocidas como una opción eficiente para el tratamiento y remoción de nutrientes como el fósforo y nitrógeno (Bermeo Castillo, 2011).

Las microalgas son organismos autótrofos fotosintéticos que constituyen el fitoplancton, son el primer eslabón de la cadena trófica y son reconocidas por su capacidad para generar compuestos de gran valor económico, así como para el tratamiento de aguas residuales, además, generan su biomasa a partir de la asimilación de nutrientes y la fotosíntesis, los cuales se ven modulados por diferentes factores o condiciones bióticos o abióticos, como la disponibilidad de nutrientes, la calidad, intensidad y disponibilidad de luz, la temperatura, la salinidad y el pH, entre otras (Gómez-Luna, 2007).

Son diversos los estudios referentes a la capacidad ficorremediadora de las microalgas, por ejemplo, Han *et al.* (2019), mencionan que en los últimos años se han realizado investigaciones que confirman el beneficio de la implementación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales acuícolas, estos estudios hacen referencia a *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* y *Scenedesmus sp.* con resultados por encima del 80% de eficiencia de remoción de nutrientes. Andreotti *et al.* (2020), trabajaron con la microalga *Tetraselmis suecica* evaluando la generación de biomasa mediante un modelo llamado BIO-ALGAE, para predecir y simular el desempeño de esta microalga para el aprovechamiento de aguas residuales acuícolas, los autores concluyen que el modelo mencionado tuvo una eficiencia de remoción por encima del 90% y que fue capaz de evaluar la productividad teórica de las microalgas simulando la eliminación y recuperación de nutrientes.

Otros trabajos sobre el aprovechamiento de aguas residuales acuícolas son los siguientes:

- Nasir *et al.* (2015) – Tratamiento de aguas residuales del bagre africano, *Clarias gariepinus*, mediante ficorremediación por la microalga *Chlorella sp.*, con bio-cosecha de *Aspergillus niger* (más del 97% de eficiencia de remoción).
- Andreotti *et al.* (2017) – Biorremediación de aguas residuales del cultivo de *Mugil cephalus* con las microalgas *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Dunaliella tertiolecta* (con eficiencia de remoción de 79-90%).
- Viegas *et al.* (2021) – Reutilización de aguas residuales del cultivo de cangrejos marrones (*Cancer pagurus*) para la producción de las microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *I. galbana* y *Nannochloropsis salina* (con una eficiencia de remoción del 100% de nutrientes para todas las microalgas).

Sin embargo, existe poca información sobre el uso de la microalga *P. cruentum* como organismo biorremediador en acuicultura. En un artículo realizado por John *et al.* (2020), donde resumen y mencionan las microalgas que han sido estudiadas para biorremediación de aguas residuales acuícolas, no se hace ninguna referencia a *P. cruentum*.

P. cruentum es una microalga perteneciente al filo Rhodophyta, posee un tamaño de 10 µm de diámetro, contiene entre 28-39% de proteína, 40-57% de polisacáridos y 9-14% de lípidos (Soeprbowati y Hariyati, 2013). Se caracteriza por su color rosado proporcionado por ficobiliproteínas, principalmente ficoeritrina, pigmento accesorio encontrado en alta concentración, con máximos reportados de 12.7% de su peso seco, 10.2% de R-ficocianina y 2.86% de aloficocianina. Este pigmento es de interés económico, ya que se ha reportado su capacidad inmunomoduladora y anticancerígena, además, se ha demostrado su uso en la coloración de alimentos y en cosmetología (Velea *et al.*, 2011 y Fernández-Duarte *et al.*, 2017).

Tabla 1. Posición taxonómica de *Porphyridium cruentum* (ITIS, 1996).

Reino	Plantae - Plantes, Planta, Vegetal, Plantas
Subreino	Bilífita
División	Rhodophyta – algas rojas
Subdivisión	Rodelofitina
Clase	Porfiridioficeas
Ordenar	Porfiridiales
Familia	Porfiridiaceas
Género	<i>Porphyridium</i> Naegeli, 1894
Especie	<i>Porphyridium cruentum</i> (Gris) Naegeli

Otra característica importante de *P. cruentum*, es que se encuentra rodeada de una cápsida compuesta por una red de un polisacárido sulfatado, el cual posee valor económico, ya que presenta propiedades similares a la goma xantana (Bernaerts *et al.*, 2018) y se ha reportado que produce hasta un 14.6% de este compuesto, siendo significativamente más alto que el obtenido por otras microalgas (Zhao *et al.*, 2021). Además, puede acumular ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ácido araquidónico (C20:4n-6) y el eicosapentaenóico (C20:5n-3) (Cohen *et al.*, 1988; Servel *et al.*, 1994).

Soeprbowati y Hariyati (2013), indican que es una microalga con una gran tolerancia a condiciones extremas de salinidad y pH, de crecimiento rápido y fácil cosecha ya que tiende a formar grumos y no genera productos tóxicos y mencionan que es idónea para la biorremediación de aguas residuales debido a su capacidad de acumular metales pesados (plomo, cadmio, cromo y cobre), logrando una reducción de entre el 70% de Cd y 96% de Cu.

En otro estudio, Ulusoy-Erol *et al.* (2020), realizaron el cultivo de *P. cruentum* en aguas residuales porcinas para la producción de ácidos grasos, resultando en un alto contenido de ácidos saturados, mayores al 67%, seguido por polinsaturados con alrededor del 22%, y finalmente monoinsaturados con menos del 12%, en este estudio no se presentaron resultados sobre la eficiencia de remoción de nutrientes, aun así, los autores concluyeron que esta especie podría usarse para la remediación de aguas residuales y producción de ácidos grasos para biocombustible.

De una manera similar, Arashiro *et al.* (2020), utilizaron las cianobacterias *Nostoc sp.* y *Arthrospira platensis*, así como la microalga *P. purpureum* y destacaron el uso potencial de esta última para el tratamiento de aguas industriales y producción de ficobiliproteínas, todas las microalgas tuvieron eficiencias de remoción por encima del 90% de los nutrientes.

Dada la importancia de implementar tecnologías que permitan el desarrollo de una acuicultura sostenible, así como de encontrar las mejores opciones para tratar las aguas residuales de los cultivos acuícolas, el presente trabajo pretende generar información sobre el uso de *P. cruentum* para la remoción de compuestos nitrogenados y fosfatos de aguas residuales del cultivo de camarón *L. vannamei*, evaluando a su vez la producción del pigmento ficoeritrina y del exopolisacárido sulfatado.

1.1 Justificación

La acuicultura es una actividad que ha permitido alcanzar grandes beneficios a nivel social y nutricional. Es una industria que hoy en día contribuye con más de la mitad de los alimentos acuáticos a nivel mundial. Sin embargo, se ha visto afectada por problemas sociales causados por afectaciones al medio ambiente, provenientes principalmente de desechos acuícolas, como las aguas residuales, las cuales contienen compuestos nitrogenados, fosfatos y carbono orgánico, que en altas concentraciones alteran el equilibrio de los ecosistemas a tal grado que pueden causar mortalidades, como el cultivo de camarón, que es mundialmente conocido por la cantidad de desechos que genera, con un efecto negativo en el medio ambiente.

En México el impacto de la camaronicultura no ha sido tan importante como en otros países, sin embargo, no deja de ser un problema que recae principalmente en la calidad del agua, por lo que se han sugerido algunas propuestas que podrían aminorar o eliminar el impacto causado por la actividad acuícola, permitiendo un desarrollo sostenible. Dentro de estas propuestas esta la acuicultura multitrófica, la cual busca el reciclado de nutrientes mediante cultivos accesorios con especies de valor, que aprovechen los residuos del cultivo primario logrando así una biorremediación de los efluentes acuícolas.

En este sentido, las microalgas adquieren gran relevancia, pues son organismos considerados eco-amigables y son una opción eficiente para el tratamiento y remoción de nutrientes de aguas residuales, como el nitrógeno y el fosfato. Además, son reconocidas por su capacidad de generar compuestos de valor económico que, aunado a su capacidad fitorremediadora, podrían reducir costos en su cultivo. Por todo lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo se estudió el cultivo de la microalga *P. cruentum* en aguas provenientes del efluente del cultivo del camarón *L. vannamei* con la intención de remover los compuestos nitrogenados y el fosfato generados durante su cultivo.

1.2 Hipótesis

La biomasa producida por la microalga *P. cruentum* cultivada en las concentraciones intermedias (75%) y altas (100%) del efluente del cultivo de *L. vannamei*, será igual o mayor que la producida en el medio control "f/2".

La microalga *P. cruentum* tendrá la capacidad de mejorar la calidad del agua, removiendo los compuestos nitrogenados y fosfatos, generados en un cultivo de *L. vannamei*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la biomasa producida por la microalga *P. cruentum* mantenida en diferentes concentraciones del agua del efluente proveniente del cultivo de camarón blanco *L. vannamei*, así como su capacidad de biorremediar el agua residual acuícola.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones (100% y 75%) del agua del efluente del cultivo de camarón *L. vannamei*, en la producción de biomasa de la microalga *P. cruentum*.
- Analizar la remoción de compuestos nitrogenados (nitratos, nitritos y amonio) y fosfatos por *P. cruentum* mantenida en diferentes concentraciones del efluente del cultivo de camarón.
- Valorar la densidad celular, la concentración del pigmento ficoeritrina y del exopolisacárido sulfatado producidos por *P. cruentum* cultivada en diferentes concentraciones del efluente del cultivo de camarón.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo y mantenimiento de *Porphyridium cruentum*

La cepa de *P. cruentum* se obtuvo del Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. A partir de la cepa se realizaron escalamientos desde 100 ml, hasta nivel fernbach de 2 L. La cepa se mantuvo en el medio “f/2” (Guillard, 1975), a 20 ± 1 °C, un pH entre 8 a 8.5, a una salinidad de 35 ups y a una intensidad de luz de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca .

2.2 Sistema de cultivo de *L. vannamei*

El agua del efluente se obtuvo de un sistema de cultivo experimental del camarón blanco *L. vannamei*, proveniente del CICESE, este cultivo estaba realizado en un sistema de recirculación con un volumen total de agua aproximado de 7 m^3 , del cual 4 m^3 correspondía al taque de cultivo, 1.5 m^3 al tanque reservorio y 1.5 m^3 al biofiltro. El tanque de cultivo contenía 150 organismos en etapa adulta con un peso promedio de 35 g, los cuales se alimentaron diariamente con un 2.5%, con base en la biomasa total del sistema, dividido en dos raciones al día, se mantuvieron en una temperatura de 29.0 ± 1 °C y una salinidad de 36 ups. Se utilizó el alimento Semi-Intensive “SI” Series – Shrimp Grower Feeds, de la marca Zeigler Bros., Inc., el cual contiene 35% de proteína cruda.

2.3 Diseño experimental

En este estudio se evaluó el cultivo de *P. cruentum* en agua proveniente del efluente de un cultivo de camarón blanco *L. vannamei*, en dos concentraciones (100% y 75%), como control se utilizó el medio “f/2” (Guillard, 1975). En cada tratamiento se tuvieron tres repeticiones. Las variables de respuesta a analizar fueron la biomasa producida en términos de densidad celular, el pigmento ficoeritrina y el exopolisacárido sulfatado, así como la remoción de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos, nitratos y fosfatos. El experimento tuvo una duración de 10 días.

El cultivo de *P. cruentum* se realizó en matraces Fernbach de 2.5 L con un volumen útil de 2 L, los cuales se inocularon con 200×10^3 cél ml⁻¹. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20 ± 1 °C), pH (8 a 8.5), salinidad (35 ups) e intensidad de luz ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las condiciones de cultivos fueron decididas con base a trabajos anteriores realizados en el laboratorio.

El agua proveniente del cultivo de *L. vannamei* fue tomada del tanque reservorio, se filtró a $1.2 \mu\text{m}$ con filtros Whatman G/F de 47 mm de diámetro y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 lb de presión. Para preparar la concentración del 75% del efluente del cultivo de camarón y el medio control, se utilizó agua de mar previamente filtrada a 10, 5 y $1 \mu\text{m}$ y posteriormente se pasó por luz ultravioleta (UV), finalmente se esterilizó en autoclave como ya se mencionó anteriormente.

2.4 Evaluación de la biomasa producida.

Para evaluar la densidad celular (cél mL⁻¹), se recolectaron diariamente muestras de 1 mL de cada unidad experimental, el recuento se realizó en una cámara Neubauer (de 0.1 mm de profundidad), con ayuda de un microscopio compuesto (Zeiss, Primo Star). Para facilitar el conteo se aplicaron diluciones con agua de mar. El cálculo para el número de células se realizó siguiendo las fórmulas indicadas en Arredondo-Vega y Voltolina (2007):

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil} \quad (1)$$

Donde:

C = Cél mL⁻¹

N = Promedio de células presentes en 1 mm^2 (0.1 μL)

Dil = Factor de dilución

10^4 = Factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL

Para calcular la tasa de crecimiento específica (μ) y el tiempo de generación (TG) se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \frac{\text{Log}_2 (N2) - \text{Log}_2 (N1)}{t2 - t1} \quad (2)$$

Donde:

μ = Tasa de crecimiento específica en días.

N1 = Número de células al tiempo t1.

N2 = Número de células al tiempo t2.

T1 = Tiempo inicial en días.

T2 = Tiempo final en días.

$$\text{TG} = 1/D \quad (3)$$

Donde:

TG = Tiempo de generación en días.

D = Divisiones por día (μ).

2.4.1 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

Para la evaluación del peso seco, se tomaron muestras con un volumen de 10 mL, estas fueron filtradas con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro y 1.2 μm de retención, previamente calcinados a 500 °C. Las muestras filtradas se lavaron con formiato de amonio al 3% para eliminar las sales,

posteriormente se colocaron en la estufa (Thermolyne Oven series 9000) a 70 °C hasta alcanzar un peso seco constante, finalmente se pesaron en una balanza analítica (A&D GR-202).

Para obtener el peso seco total (PST), se aplicó la siguiente fórmula (Sorokin, 1973):

$$\text{PST } (\mu\text{g mL}^{-1}) = [(\text{PSFM}) - \text{PSF}] / \text{VF} \quad (4)$$

Donde:

PST = Peso seco total.

PSFM = Peso seco del filtro con muestra

PSF = Peso seco del filtro sin muestra

VF = Volumen de muestra filtrado

Tras obtener el PST, los filtros fueron calcinados en la mufla a 500 °C por 12 h, pasado el tiempo se pesaron en una balanza analítica (A&D GR-202), finalmente con la diferencia entre el peso seco total y las cenizas se obtuvo el peso seco orgánico (PO):

$$\text{PC } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (\text{PSC} - \text{PSF}) / \text{VF} \quad (5)$$

Donde:

PC = Peso de cenizas

PSC = Peso seco del filtro con la muestra incinerada

PSF = Peso seco del filtro sin muestra

VF = Volumen de muestra filtrado.

$$PO (\mu\text{g mL}^{-1}) = PST - PC \quad (6)$$

Donde:

PO = Peso seco orgánico

PST = Peso seco total

PC = Peso de cenizas

VF = Volumen de muestra filtrado.

2.4.2 Análisis de ficoeritrina

Para el análisis de ficoeritrina se utilizó el método de Bennett y Bogorad (1973). Durante el cultivo de *P. cruentum* se realizaron cuatro muestreos (dos en la fase exponencial y dos en la fase de crecimiento lento), para lo cual se recolectaron volúmenes de 10 mL de cada unidad experimental y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 10° C, se eliminó el sobrenadante y se conservó el paquete celular, el que se congeló para su análisis posterior. Después las muestras se descongelaron a temperatura ambiente (aproximadamente a 20 °C), se les aplicó ultrasonido en un baño con hielo por 6 min, enseguida se congeló con nitrógeno líquido (a -96 °C) durante 15 min y se descongeló a temperatura ambiente. Este último proceso de congelación y descongelación se realizó dos veces con el fin de garantizar la extracción total del pigmento. Terminado el proceso de descongelación, las muestras se centrifugaron (Thermo Fisher, Heraeus Megafuge 16R) a 3000 rpm durante 15 min a 10 °C y el sobrenadante fue separado y colocado en tubos limpios. Finalmente, las muestras se analizaron en un espectrofotómetro (lector de placas, Beckman Coulter AD 200) en diferentes longitudes de onda: 565, 620 y 650 nm.

Para conocer la concentración de ficoeritrina se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ficoeritrina (PE)} = (A_{565} - 2.8 \cdot PC - 1.34 \cdot APC) / 12.7 \quad (7)$$

$$\text{Ficocianina (PC)} = (A_{620} - 0.7 \cdot A_{650}) / 7.38 \quad (8)$$

$$\text{Aloficocianina (APC)} = (A_{650} - 0.19 \cdot A_{620}) / 5.65 \quad (9)$$

2.4.3 Análisis de la composición del exopolisacárido sulfatado (EPS)

Para este análisis se siguió la técnica descrita en Hernández Garibay (2011). Se recolectaron muestras de 50 mL de cada una de las repeticiones en los distintos tratamientos del cultivo de *P. cruentum*, dos en la fase exponencial y dos en la fase de crecimiento lento, estas se colocaron en un vaso de precipitado y se le agregaron 10 g de tierra de diatomeas, se agitaron y filtraron al vacío (≤ 0.2 bar) usando un filtro Whatman de 90 mm de diámetro y malla de plástico de 200 μm , el líquido obtenido fue filtrado con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, de 47 mm de diámetro y 1.2 μm de retención. Se midió el volumen colectado y se llevó a una concentración de 0.1 M con NaCl, luego se agregaron dos volúmenes de etanol al 100%, se agitó con una varilla de vidrio y al mismo tiempo se colectaron la mayoría de las fibras del polisacárido y se prensaron manualmente para extraer y retirar la mayor parte del agua y del etanol, formando un pellet.

El pellet obtenido se lavó con 25 mL de etanol al 70 % y se dejó reposar durante 10 min para retirar las sales, el proceso se realizó dos veces, seguidamente el pellet se colocó en 25 mL de etanol al 100% y se agitó por 10 min, posteriormente se retiró el etanol y el pellet se colocó en una charola de plástico, se dejó secar en estufa (Thermolyne 9000) por 1 h a 60° C para finalmente ser pesado en una balanza analítica.

El líquido filtrado con etanol, de donde se obtuvo el pellet, se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente), en el concentrado se aplicó el mismo procedimiento indicado anteriormente. Los pellets ya secos se pesaron en una balanza analítica para conocer la cantidad de exopolisacárido obtenido en cada muestra.

2.5 Evaluación de nutrientes

Para la evaluación de la remoción de los nutrientes por parte de *P. cruentum*, cada dos días se tomaron 10 mL del cultivo de microalgas de cada una de las repeticiones de los tratamientos, las microalgas se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min, posteriormente se retiró el sobrenadante para el análisis de los nutrientes y el pellet se almacenó para la extracción de ficoeritrina, como se mencionó anteriormente.

2.5.1 Nitrógeno amoniacal total (NAT)

Para el análisis de NAT se empleó el método azul de indofenol indicado en APHA (1999) modificado por Hernández-López y Vargas-Albores (2003) y Adams (2017). Para esto, se tomó 1 mL de los 10 mL muestreados de cada unidad experimental, se le agregaron 40 μL de fenol, 40 μL de nitroprusiato de sodio, 80 μL de reactivo alcalino y 20 μL de cloro y se dejó encubar en obscuridad por 60 min. Una vez pasado el tiempo, se tomaron 250 μL de cada repetición, se colocaron en una placa multipozos y se leyeron las absorbancias en un lector de placa, a una longitud de onda de 640 nm.

2.5.2 Nitratos (NO_3^-)

La medición de los nitratos se realizó mediante espectrometría de absorción ultravioleta, siguiendo el método indicado en Collos *et al.* (1999) el cual no requiere reactivos, se tomaron 250 μL del sobrenadante obtenido del centrifugado del cultivo de microalgas y la absorbancia se midió a 220 nm en un lector de placas.

2.5.3 Nitritos (NO_2^-)

Para la cuantificación de nitritos se utilizó una reacción colorimétrica derivada de una reacción de Griess descrita por Tsikas (2005). Se prepararon dos reactivos: A (0.5 g de sulfanilamida + 5 mL de HCl concentrado en 50 mL de agua desionizada) y B (0.5 g de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato en 50 mL de agua desionizada), de los cuales se utilizaron 40 μL de cada uno y se agregaron a 1 mL de cada una de las muestras. Posteriormente se dejó encubar por 10 min, se tomaron 250 μL de la mezcla Y finalmente, se leyó la absorbancia a 540 nm.

2.5.4 Fosfatos (PO_4^{3-})

Para la cuantificación de fosfatos se utilizó el método colorimétrico descrito en Murphy y Riley (1962) y Strickland y Parsons (1972), donde a 1 mL de muestra se le agregó 1 parte de solución de heptamolibdato de amonio (35%), 2.5 partes de solución de ácido sulfúrico concentrado (14%), 1 parte de ácido ascórbico (1.08%) y 0.5 partes de tartrato de antimonio y potasio (0.0136%). La absorbancia se leyó a 882 nm.

2.6 Análisis estadístico y procesamiento de datos

A todos los datos obtenidos durante el experimento se les aplicó estadística descriptiva (promedio \pm error estándar). Se realizaron evaluaciones de supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene), a los datos que cumplieron con los supuestos se les aplicó análisis paramétricos (Análisis de varianza: ANOVA), los que no cumplieron con dichos supuestos se les aplicó estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis). Se trabajó con un intervalo de confianza del 95% y se realizaron pruebas posthoc (Tukey HSD) para la identificación de grupos homogéneos, mediante el programa de estadística R Studio (con lenguaje de programación R).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Biomasa

En la figura 1 se muestra el crecimiento de *P. cruentum* cultivada en diferentes tratamientos. El cultivo tuvo una duración de 10 días, donde fueron evidentes las diferentes fases de crecimiento. No se observaron diferencias entre los tratamientos en los diferentes días de cultivo ($p > 0.05$), la biomasa promedio final entre tratamientos fue de $2,635 \pm 166.3 \times 10^3$ cél ml⁻¹.

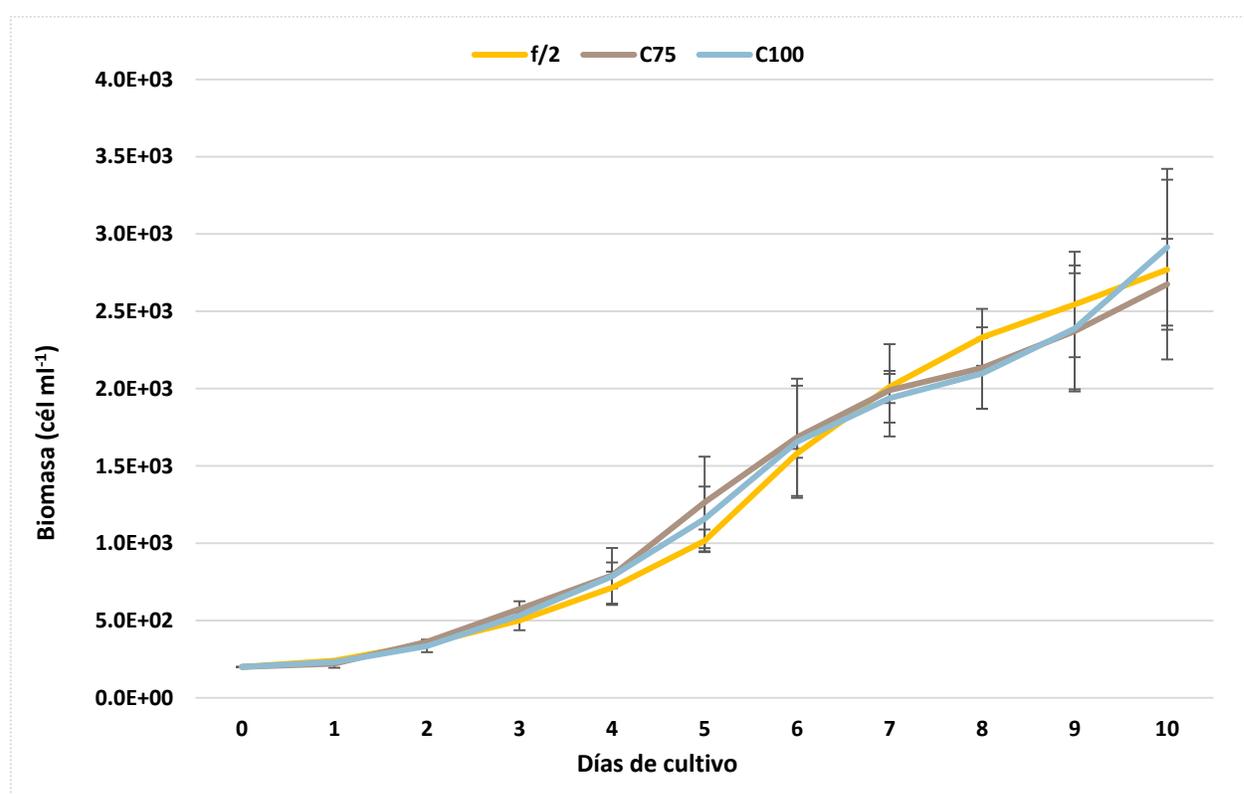


Figura 1. Biomasa (cél ml⁻¹ x 10³) de *Porphyridium cruentum* cultivada con tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar.

En cuanto a la tasa de crecimiento, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos por día ($p > 0.05$), en la tabla 2 se puede observar que la fase exponencial se presentó al segundo día y duró hasta el día seis en los tratamientos "f/2 y C100", con una tasa promedio de $0.58 \text{ div día}^{-1}$, mientras que en C75 finalizó el día cinco, con $0.67 \text{ div día}^{-1}$. No se presentaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento

entre estos días ($p>0.05$), la fase de crecimiento lento duró hasta el día diez en los tres tratamientos, con una tasa promedio de $0.19 \text{ div día}^{-1}$, sin diferencias significativas entre los últimos días de cultivo ($p>0.05$).

Tabla 2 Tasa de crecimiento (μ : divisiones día^{-1}) de *Porphyridium cruentum* cultivada en diferentes tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Valores de la tasa de crecimiento (μ) arriba de 0.5 se considera fase exponencial.

Medio Día	Tasa de crecimiento (μ : divisiones día^{-1})*										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
f/2	0.00	0.26	0.55	0.51	0.51	0.51	0.64	0.35	0.21	0.13	0.12
		\pm 0.05	\pm 0.06	\pm 0.18	\pm 0.03	\pm 0.22	\pm 0.11	\pm 0.05	\pm 0.13	\pm 0.08	\pm 0.10
C75	0.00	0.14	0.71	0.66	0.46	0.67	0.41	0.24	0.10	0.15	0.17
		\pm 0.17	\pm 0.18	\pm 0.10	\pm 0.27	\pm 0.45	\pm 0.20	\pm 0.13	\pm 0.08	\pm 0.17	\pm 0.08
C100	0.00	0.21	0.54	0.67	0.56	0.56	0.52	0.23	0.11	0.19	0.29
		\pm 0.05	\pm 0.20	\pm 0.13	\pm 0.35	\pm 0.33	\pm 0.11	\pm 0.23	\pm 0.10	\pm 0.12	\pm 0.01

* Tasa de crecimiento promedio \pm error estándar.

3.1.1 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

En el análisis del PST en $\mu\text{g ml}^{-1}$ se observó un aumento en los tres tratamientos conforme pasaron los días de cultivo, en general, el mayor peso se observó en el día diez ($p<0.05$) en los tres tratamientos (promedio: $881 \pm 36.24 \mu\text{g ml}^{-1}$) (figura 2); por lo contrario, el peso más bajo ($p<0.05$) se observó del día cuatro al ocho en el tratamiento "f/2" ($644 \pm 53.35 \mu\text{g ml}^{-1}$), mientras que en el tratamiento C75 se observó el PST más bajo se observó entre el día cuatro y seis ($p>0.05$) ($645 \pm 31.66 \mu\text{g ml}^{-1}$ en promedio) y en C100 el más bajo ($p<0.05$) se observó al día cuatro ($573 \pm 37.85 \mu\text{g ml}^{-1}$). Por otro lado, en la comparación entre tratamientos por cada día de cultivo, únicamente se observaron diferencias significativas en el día seis ($p<0.05$), entre los tratamientos "f/2" y C100 con 637 y 760 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos los días restantes ($p>0.05$).

En la figura 3 se presentan los resultados del PST en pg cél^{-1} . En el día cuatro se registraron los valores más altos en los tres tratamientos, con un promedio de $787.3 \pm 31.60 \text{ pg cél}^{-1}$, sin diferencias significativas entre estos tratamientos para este día ($p>0.05$). En los días posteriores se registraron los pesos más bajo en los tres tratamientos ($p<0.05$), con resultados similares entre éstos, por cada día de cultivo ($p>0.05$), y con un promedio general en los días 6, 8 y 10, de $367 \pm 47.65 \text{ pg cél}^{-1}$.

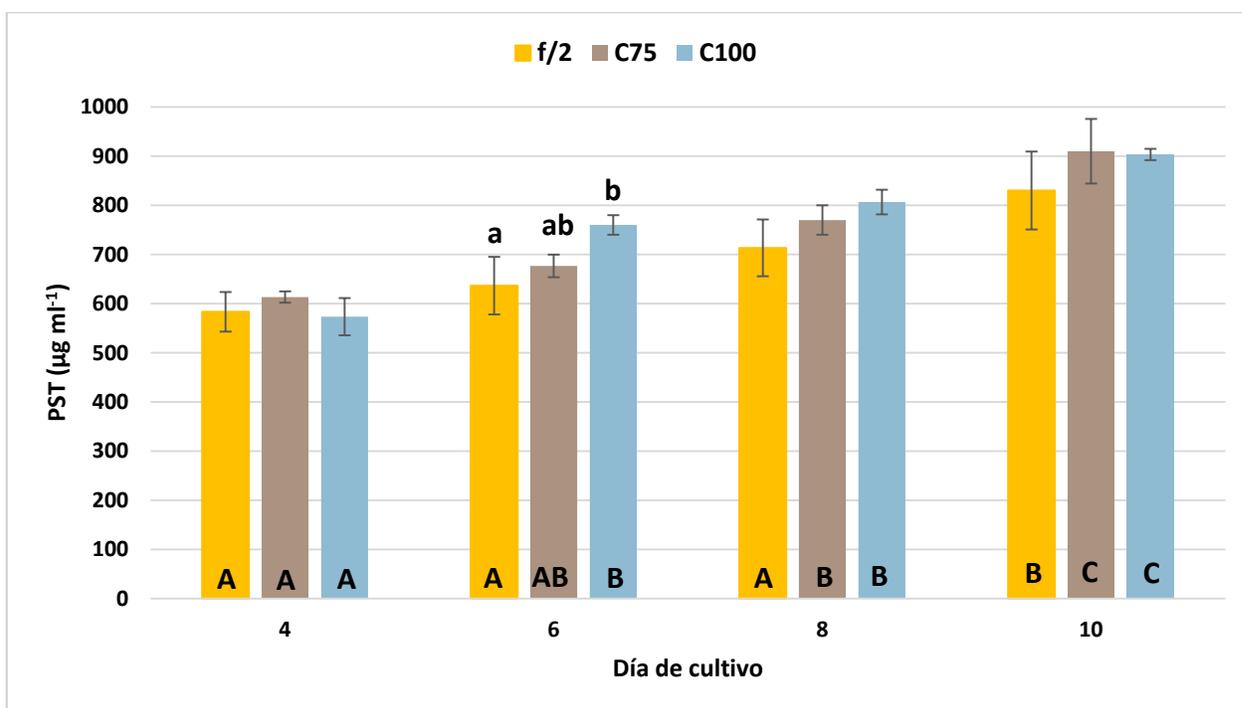


Figura 2. Peso seco total (PST) ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

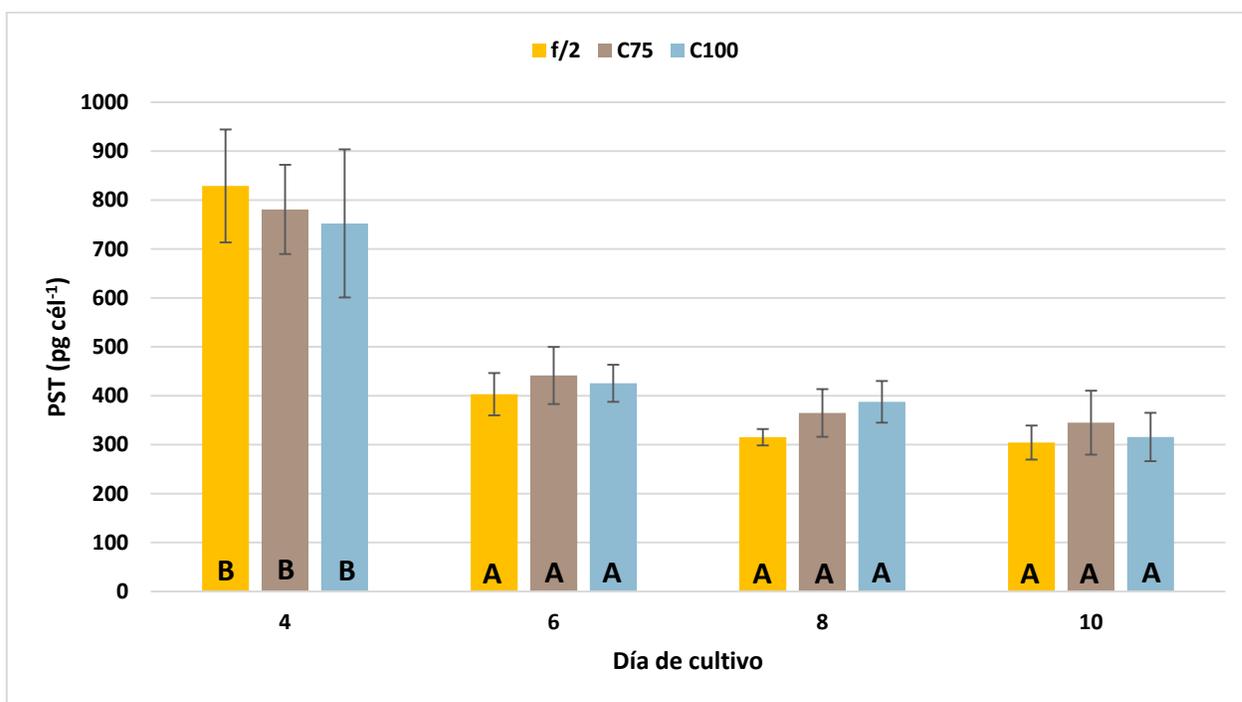


Figura 3. Peso seco total (PST) (pg cél^{-1}) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

Con relación al peso orgánico (PO) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ (figura 4), se registró un incremento significativo ($p < 0.05$) en los tres tratamientos conforme pasaron los días de cultivo, sin diferencias significativas entre tratamientos por cada día ($p > 0.05$), los valores promedio obtenidos en cada día fueron $153 \mu\text{g ml}^{-1}$, $220.3 \mu\text{g ml}^{-1}$, $266.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $387 \mu\text{g ml}^{-1}$ para los días cuatro, seis, ocho y diez, respectivamente. En el último día se registraron los valores más altos en los tres tratamientos ($p > 0.05$). Considerando el PO por tratamiento en los diferentes días, se observó que en el tratamiento “f/2” se obtuvieron valores similares ($p > 0.05$) del día cuatro al ocho, con un promedio de $210 \mu\text{g ml}^{-1}$, y el peso más alto se observó al día diez con $417 \pm 102 \mu\text{g ml}^{-1}$, respecto al tratamiento C75 el PO más bajo se observó en los días cuatro y seis con un promedio de $185 \pm 31.66 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que el más alto también se registró en el día diez con $397 \pm 55.07 \mu\text{g ml}^{-1}$, el tratamiento C100 presentó el PO más bajo al día cuatro con $153 \pm 11.54 \mu\text{g ml}^{-1}$ mientras que el más alto se observó en los días ocho y diez con $307 \pm 40.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ en promedio.

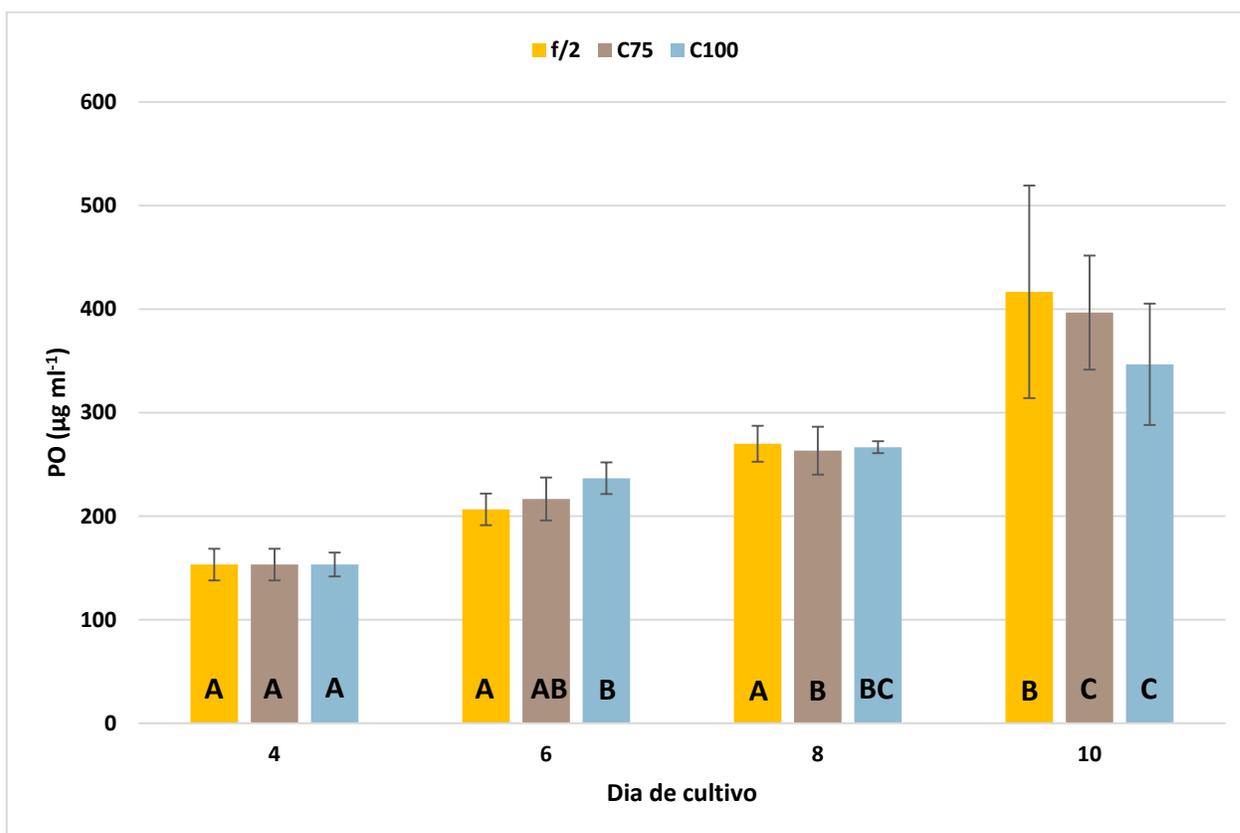


Figura 4. Peso seco orgánico (PO) ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

Respecto al PO en pg cél^{-1} , no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos por cada día de cultivo ($p > 0.05$). Por otro lado, las mayores concentraciones se observaron en el día cuatro en los

tratamientos "f/2" y C100 ($p < 0.05$), con un valor promedio de $209 \pm 9 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$, posterior a este día se registró una disminución significativa ($p < 0.05$) en estos tratamientos del día seis al diez, en los cuales se obtuvo un promedio de $134.33 \pm 10 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ (figura 5). En el tratamiento C75 no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$) del PO entre días de cultivo y se registró un promedio de $148 \pm 29 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$.

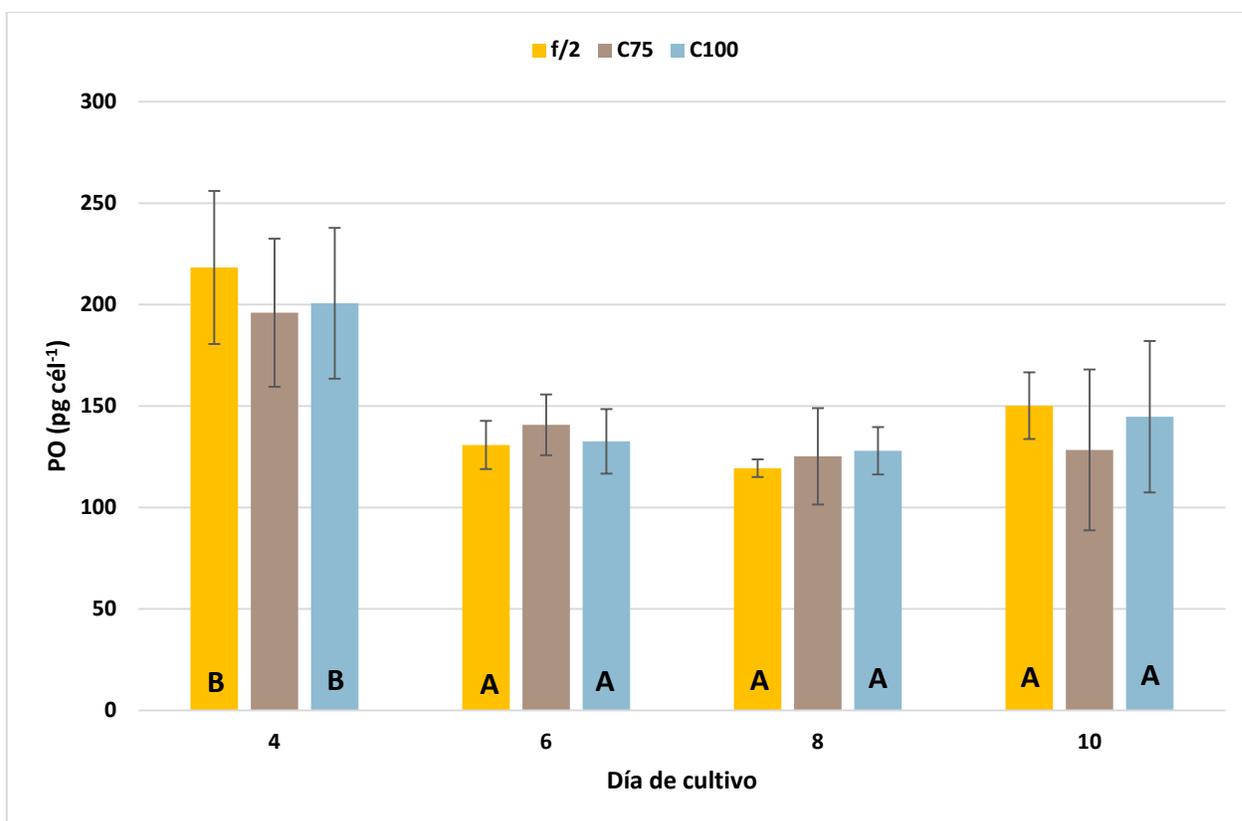


Figura 5. Peso seco orgánico (PO) ($\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

3.1.2 Ficoeritrina

El contenido de ficoeritrina, en $\mu\text{g ml}^{-1}$, se observa en la figura 6. En los días cuatro y seis, el tratamiento control "f/2" mostró mayor contenido (8.0 ± 0.63 y $21.7 \pm 3.15 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente) que los tratamientos con agua del efluente del cultivo de camarón C75 y C100, en los cuales, en general, no se observaron diferencias significativas entre éstos en los días cuatro, seis y ocho, los valores promedio obtenidos en estos tratamientos fueron: 2.6 ± 0.10 , 7.6 ± 0.19 y $17.2 \pm 0.19 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente ($p > 0.05$). En el día diez se observó el menor contenido de ficoeritrina en C100 ($14.0 \pm 2.06 \mu\text{g ml}^{-1}$), mientras que en los tratamientos con "f/2" y C75 se obtuvo en promedio un 43.1% más ficoeritrina que en C100 ($24.6 \pm 1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ en promedio) ($p < 0.05$). Con respecto al contenido de ficoeritrina en cada

tratamiento a través del tiempo, se observó que en el tratamiento “f/2” la concentración más alta ($p < 0.05$) se registró en los días seis, ocho y diez, sin diferencias significativas entre días ($p > 0.05$), con un promedio de $26.0 \pm 3.37 \mu\text{g ml}^{-1}$, y la concentración más baja se observó al día cuatro ($8.0 \pm 0.63 \mu\text{g ml}^{-1}$); respecto a C75 y C100, la concentración significativamente más baja ($p < 0.05$) se observó entre los días cuatro y seis en ambos tratamientos ($5.1 \pm 2.47 \mu\text{g ml}^{-1}$ en promedio), mientras que la concentración significativamente más alta se observó al día diez en el tratamiento C75 ($23.1 \pm 3.36 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($p < 0.05$) y al día ocho en el tratamiento C100 ($20.8 \pm 3.16 \mu\text{g ml}^{-1}$).

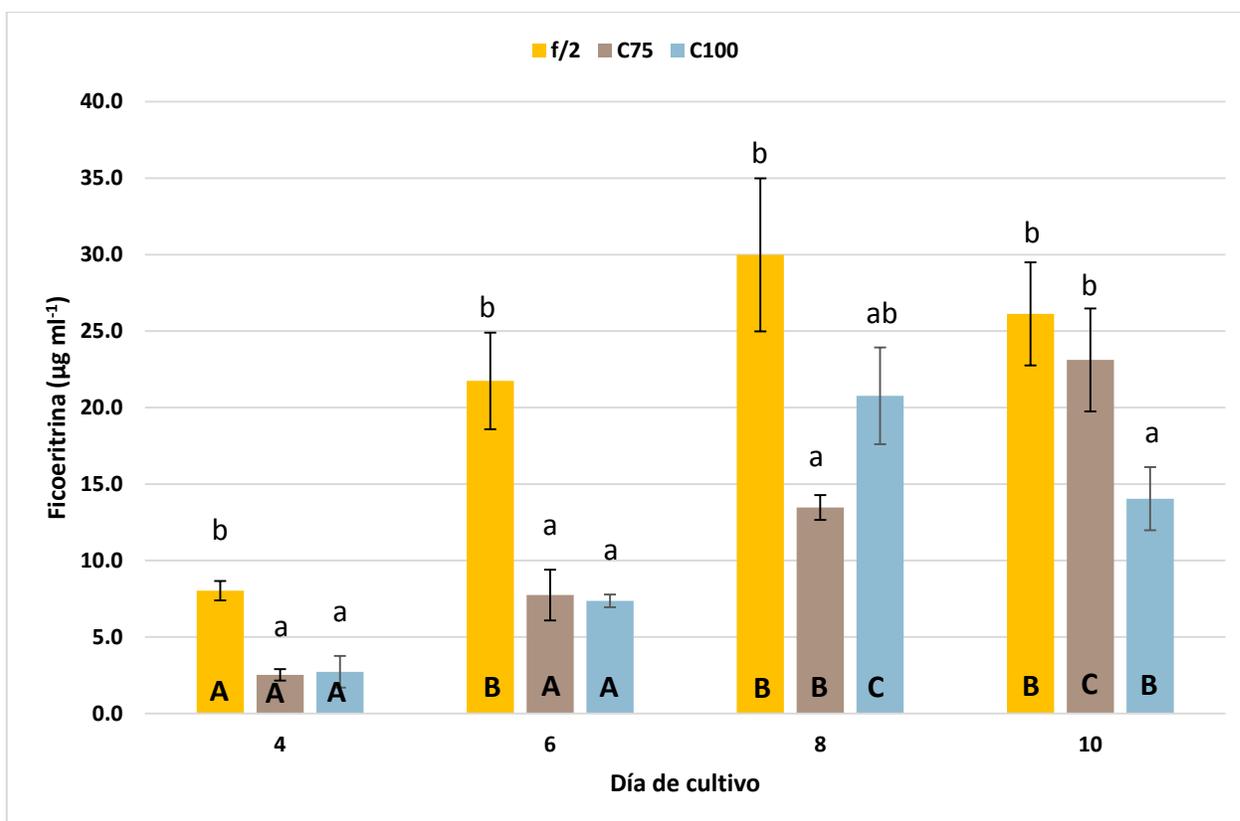


Figura 6. Concentración de ficoeritrina ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

Con relación a la concentración de ficoeritrina en pg cél^{-1} (figura 7), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos por cada día de cultivo (a excepción el día diez), en el tratamiento “f/2”, se obtuvieron las mayores concentraciones en los días cuatro y seis ($p < 0.05$), con valores de 11.3 ± 0.80 y $13.7 \pm 1.76 \text{ pg cél}^{-1}$, respectivamente. En el día ocho se observó una menor concentración de ficoeritrina en C75 ($6.4 \pm 0.66 \text{ pg cél}^{-1}$) que en el tratamiento “f/2” (12.9 pg cél^{-1}) ($p < 0.05$), en el caso del

tratamiento C100 ($10.1 \pm 2.46 \text{ pg cél}^{-1}$) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) contra C75 y “f/2” en este mismo día.

Respecto al contenido de ficoeritrina de cada tratamiento en los diferentes días de cultivos, no se observaron diferencias significativas en la concentración ($p > 0.05$) en “f/2” entre los diferentes días de cultivo ($12.0 \pm 1.51 \text{ pg cél}^{-1}$ en promedio), mientras que en el tratamiento C100 se observó que la concentración significativamente más alta ($p < 0.05$) en el día ocho ($10.1 \pm 2.46 \text{ pg cél}^{-1}$) y al día diez la concentración disminuyó un 50.0% ($5.0 \pm 1.41 \text{ pg cél}^{-1}$) ($p < 0.05$).

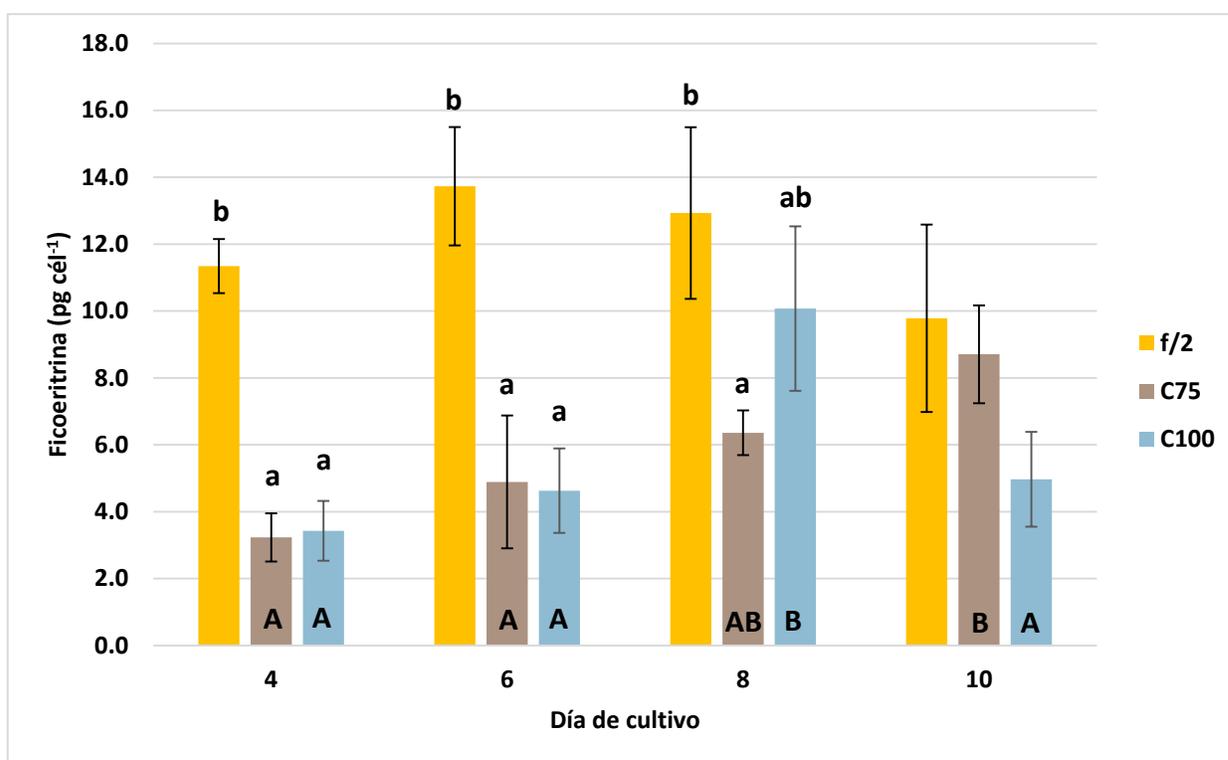


Figura 7. Contenido promedio de ficoeritrina (pg cél^{-1}) de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C$.

3.1.3 Exopolisacárido (EPS)

En el contenido de EPS entre tratamientos por cada día de cultivo, se encontraron valores similares, alrededor de 3.0 mg ml^{-1} ($p > 0.05$), con excepción del día diez, donde se presentaron diferencias

significativas entre tratamientos, el tratamiento control “f/2” contenía significativamente menor contenido de EPS ($3.11 \pm 0.50 \text{ mg ml}^{-1}$) ($p < 0.05$) que los tratamientos C75 y C100 (con promedio de $3.6 \pm 0.03 \text{ mg ml}^{-1}$). En cuanto al contenido observado en cada tratamiento a lo largo del cultivo, este se mantuvo, en general, sin diferencias significativas entre los días de cultivo ($p > 0.05$).

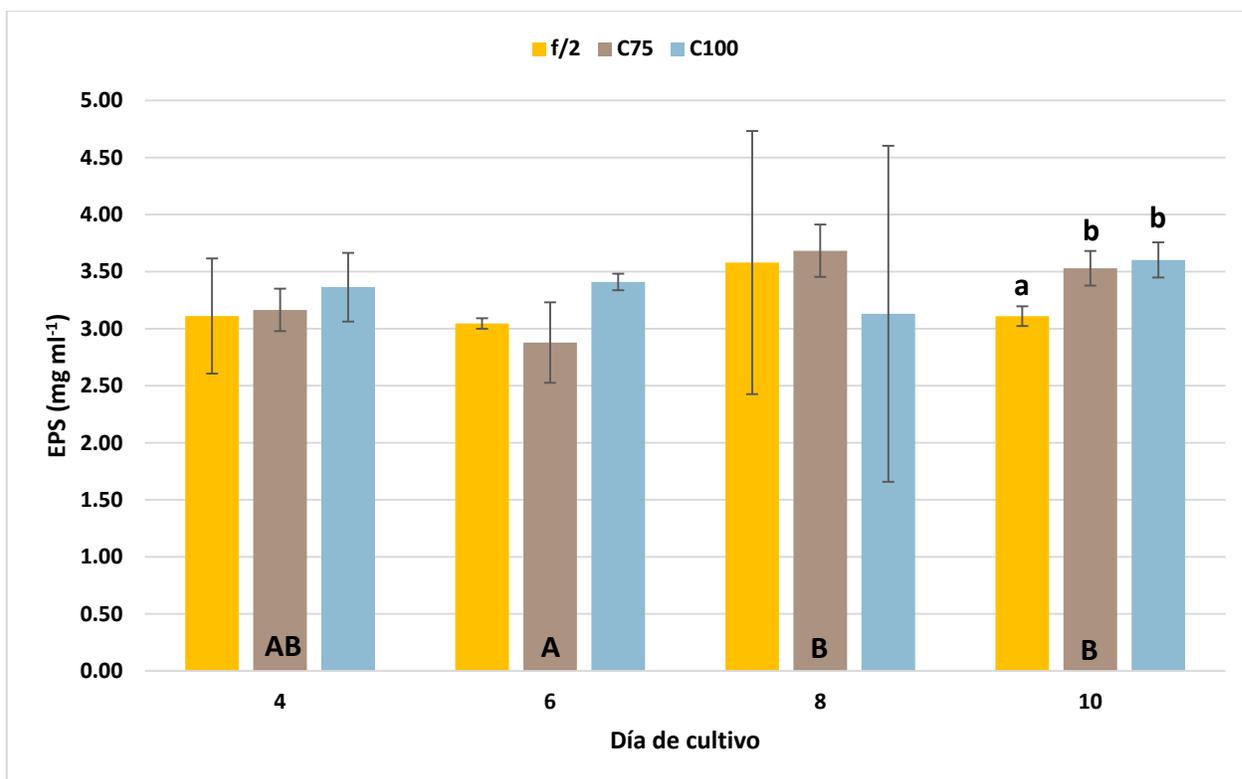


Figura 8. Producción de exopolisacárido sulfatado (EPS, mg ml^{-1}) por *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B$.

3.2 Nutrientes

Tabla 3 Características del efluente del cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Temperatura	$29 \pm 1^\circ \text{C}$
Salinidad	36 ups
Nitrógeno amoniacal total (NAT)	$0.056 \pm 0.9\text{E}^{-3} \text{ mg L}^{-1}$
Nitritos	$0.1 \pm 0.69\text{E}^{-2} \text{ mg L}^{-1}$
Nitratos	$51.54 \pm 1.37 \text{ mg L}^{-1}$
Fosfatos	$0.27 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$

La evaluación de los nutrientes mostró diferentes concentraciones iniciales de los mismos, a continuación, en la tabla 3, se muestran las características del efluente proveniente del cultivo de camarón.

3.2.1 Nitrógeno amoniacal total (NAT)

Los valores iniciales (día 0) de nitrógeno amoniacal total (NAT) residual (figura 9), fueron significativamente más elevados en los tratamientos con agua del efluente del cultivo de *L. vannamei* (C100 y C75), siendo el tratamiento C100 donde se observó la concentración más alta, con $0.06 \pm 0.003 \text{ mg L}^{-1}$ ($p < 0.05$), mientras que el tratamiento control "f/2" fue el que mostró la concentración de NAT más baja ($0.03 \pm 0.002 \text{ mg L}^{-1}$) ($p < 0.05$) y el tratamiento C75, con un valor intermedio (0.05 mg L^{-1}), en los días 2, 4 y 8 no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), y donde se obtuvo un promedio general de 0.03 mg L^{-1} , al día diez se observó una concentración residual de NAT significativamente mayor en el tratamiento control "f/2" ($0.03 \pm 0.001 \text{ mg L}^{-1}$) ($p < 0.05$); en los tratamientos C75 y C100 se obtuvieron valores similares, con un promedio de $0.016 \pm 0.002 \text{ mg L}^{-1}$.

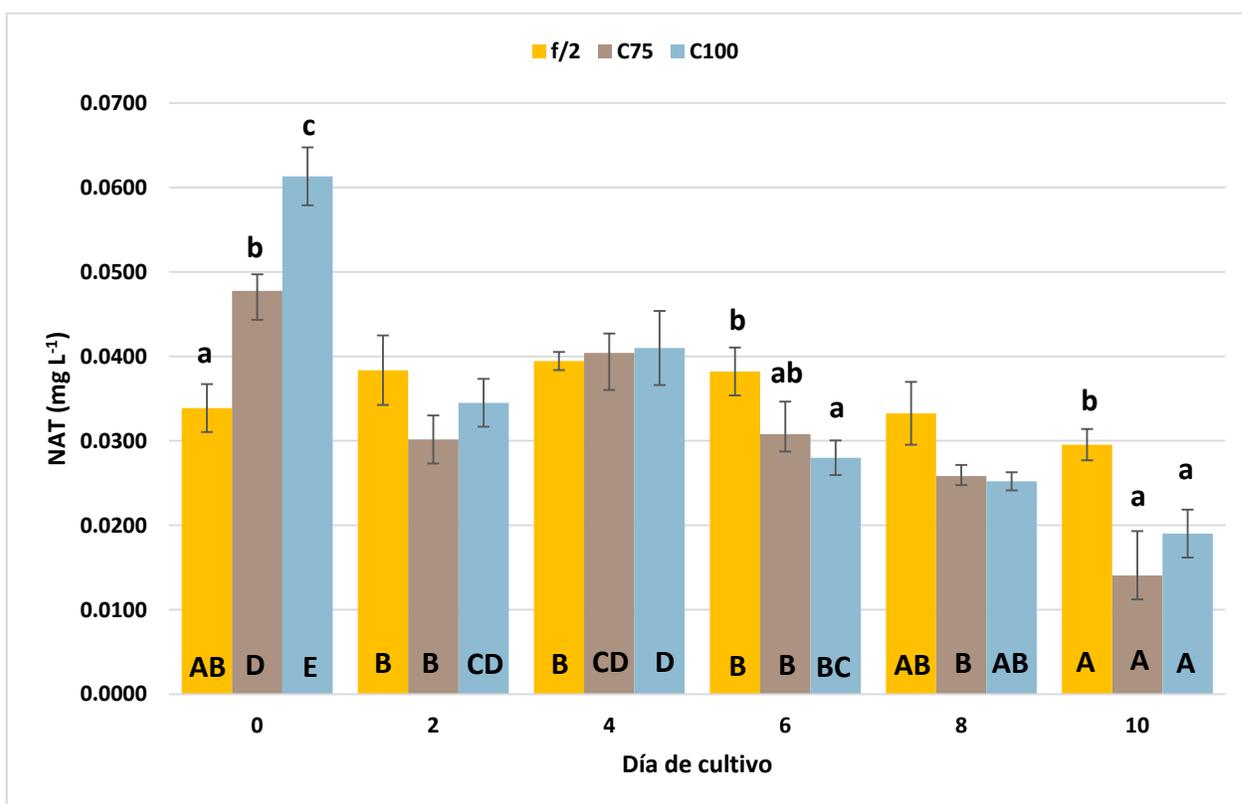


Figura 9. Concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT, mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D < E$.

Con relación a las concentraciones residuales de NAT en cada tratamiento a lo largo del cultivo, se observa que en el tratamiento “f/2” las concentraciones fueron, en general, muy similares, con valores entre 0.03 y 0.04 mg L⁻¹; por otro lado, en el tratamiento C75 la concentración significativamente más alta ($p < 0.05$) se observó en el día inicial (día 0) y cuatro, con 0.04 ± 0.002 mg L⁻¹, mientras que la concentración significativamente más baja ($p < 0.05$) se observó en el día diez (0.014 ± 0.005 mg L⁻¹), respecto al tratamiento C100, la concentración significativamente más alta ($p < 0.05$) se observó en el día inicial (día 0) con 0.061 ± 0.003 mg L⁻¹, por lo contrario, la concentración significativamente más baja ($p < 0.05$) se observó entre los días ocho y diez con 0.023 ± 0.003 mg L⁻¹ en promedio.

Con respecto a la eficiencia de remoción de NAT residual (Tabla 4), los tratamientos C75 y C100 mostraron una eficiencia de remoción más alta a lo largo del cultivo ($p < 0.05$) que el tratamiento “f/2”, este último tratamiento mantuvo porcentajes de remoción significativamente más bajos durante todo el cultivo, y en el día diez, el porcentaje acumulado fue del $29.0 \pm 5.09\%$; mientras que en los tratamientos con efluente del cultivo de camarón C75 y C100 el porcentaje acumulado para el día diez fue del $72.5 \pm 0.29\%$ en promedio.

Tabla 4 Eficiencia de remoción por día de nitrógeno amoniacal total (NAT, %) por *Porphyridium cruentum* cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).

Medio / Día	Eficiencia de remoción acumulada de NAT (%)					
	0	2	4	6	8	10
f/2	0	0 ^a	3.0 ± 5.6 ^a	8.0 ± 7.1 ^a	20.0 ± 11.1 ^a	29.0 ± 5.1 ^a
C75	0	37.0 ± 7.4 ^b	30.0 ± 5.5 ^b	46.0 ± 10.3 ^b	56.0 ± 7.4 ^b	73.0 ± 6.2 ^b
C100	0	44.0 ± 3.7 ^b	40.0 ± 5.1 ^b	59.0 ± 3.7 ^b	63.0 ± 2.3 ^b	72.0 ± 3.9 ^b

*Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos por cada día, a<b.

3.2.2 Nitratos (NO₃⁻)

En la figura 10 se presentan las concentraciones de nitrato residual. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones iniciales (día 0) ni en el día cuatro de los tratamientos “f/2” y C100, el promedio de estos tratamientos en estos días fue de 52.0 ± 1.0 y 37.4 ± 1.07 mg L⁻¹, respectivamente, siendo la concentración en estos dos tratamientos, significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del tratamiento C75, donde se obtuvieron valores de 41.77 ± 0.90 mg L⁻¹ (día 0) y 28.17 mg L⁻¹ (día 4). En el día dos la concentración más alta fue en “f/2”, con 45.0 mg L⁻¹, mientras que en los días seis y ocho, el tratamiento C100 mostró una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) (31.69 y 19.79

mg L⁻¹, respectivamente), que el tratamiento C75 y el control “f/2” sin diferencias significativas entre estos ($p>0.05$), donde se obtuvieron promedios de 20.1 ± 1.0 mg L⁻¹ (día seis) y 6.70 ± 1.1 mg L⁻¹ (día ocho), Al último día de cultivo (día 10), no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre “f/2” y C75 (promedio: 4.09 ± 0.19 mg L⁻¹); de igual forma, el tratamiento C75 no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) con C100 (promedio, 5.87 ± 1.31 mg L⁻¹), pero sí se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre “f/2” y C100.

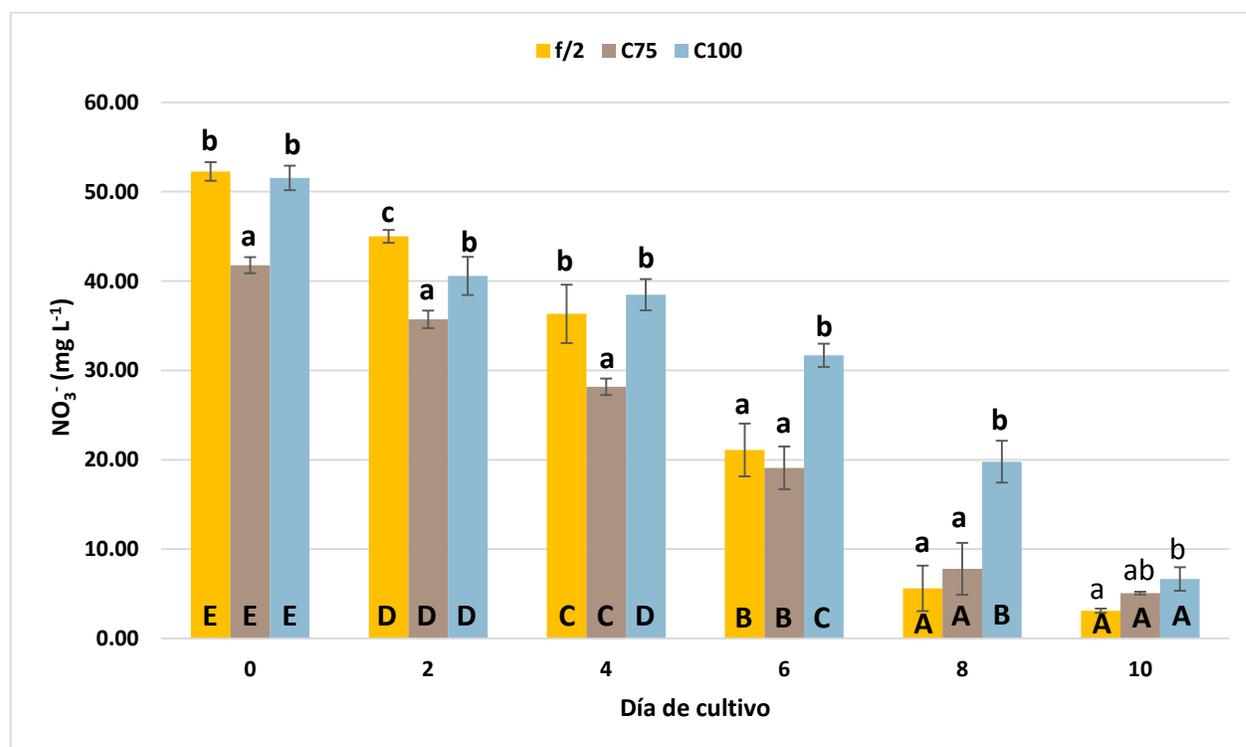


Figura 10. Concentración de nitratos (NO_3^- , mg L⁻¹) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D < E$.

Respecto a la concentración residual de nitratos de cada uno de los tratamientos en los diferentes días, se observó que la concentración residual en “f/2” fue significativamente más alta ($p<0.05$) en el día inicial (día 0), con 52.25 ± 1.04 mg L⁻¹, posteriormente se registró una disminución paulatina a través del tiempo, con concentraciones mínimas en el día ocho y diez (promedio 4.4 ± 1.25 mg L⁻¹), sin diferencias significativas entre estos días. En el caso del tratamiento C75 la concentración inicial registrada fue de 41.77 ± 0.90 mg L⁻¹, y también se observó la misma tendencia de disminución significativa en los días posteriores, los valores significativamente más bajos se observaron en los días ocho y diez ($p<0.05$), con

un valor promedio entre estos dos días de $6.44 \pm 1.35 \text{ mg L}^{-1}$. Asimismo, en el tratamiento C100 igualmente se observó un descenso gradual en las concentraciones, con el valor más alto ($p < 0.05$) en el día 0 ($51.54 \pm 1.37 \text{ mg L}^{-1}$), hasta el menor valor en el día diez (6.7 mg L^{-1}),

En relación con la eficiencia de remoción de nitratos, en los tres tratamientos se observó un incremento al transcurrir de los días, en los dos primeros muestreos (día dos y cuatro) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, con promedios en cada día de 17.0 ± 3.35 y $30.0 \pm 3.15\%$ respectivamente, mientras que en los días seis y ocho, los mayores valores se obtuvieron en "f/2" y C75, con porcentajes promedio de 57.2 (día seis) y 85.3 (día ocho), respectivamente, sin embargo, al día diez la mayor remoción se presentó en el tratamiento con el medio "f/2" ($p < 0.05$), con un 94.1%, mientras que entre C75 y C100 no se observaron diferencias significativas en este día, y se obtuvo un valor promedio de $87.6 \pm 0.57\%$.

Tabla 5 Eficiencia de remoción de nitratos (NO_3^- , %) por *Porphyridium cruentum* cultivada en diferentes tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).

Medio / Día	Eficiencia de remoción acumulada de NO_3^- (%)					
	0	2	4	6	8	10
f/2	0	14.0 ± 2.49	30.5 ± 7.18	60.0 ± 6.06^b	89.3 ± 4.99^b	94.1 ± 0.51^b
C75	0	14.5 ± 4.23	33.6 ± 3.73	54.3 ± 6.56^b	81.3 ± 7.16^b	88.0 ± 0.14^a
C100	0	21.3 ± 4.26	25.4 ± 2.01	38.5 ± 4.11^a	61.6 ± 5.44^a	87.1 ± 3.09^a

*Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos por cada día. $a < b$.

3.2.3 Nitritos (NO_2^-)

El análisis de las concentraciones de nitritos residuales mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Las concentraciones iniciales (día 0) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos (figura 11), la mayor concentración se observó en C100, con 0.10 mg L^{-1} , seguido de C75 (0.07 mg L^{-1}) y en el tratamiento "f/2" no se detectó este nutriente. Al día dos se observó una concentración residual significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento C100 (0.16 mg L^{-1}) que los tratamientos "f/2" y C75, los cuales no fueron diferentes entre sí ($p > 0.05$) y se obtuvo un promedio de 0.11 mg L^{-1} . Por otro lado, del día cuatro al ocho los tratamientos C75 y C100 tuvieron los valores más altos, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), los valores promedio observados en estos dos tratamientos fueron: 0.21, 0.36 y 0.39 mg L^{-1} , en los días cuatro, seis y ocho, respectivamente. En el día diez, la concentración residual de nitritos fue más alta en el tratamiento C100 ($p < 0.05$), con 0.28 mg L^{-1} .

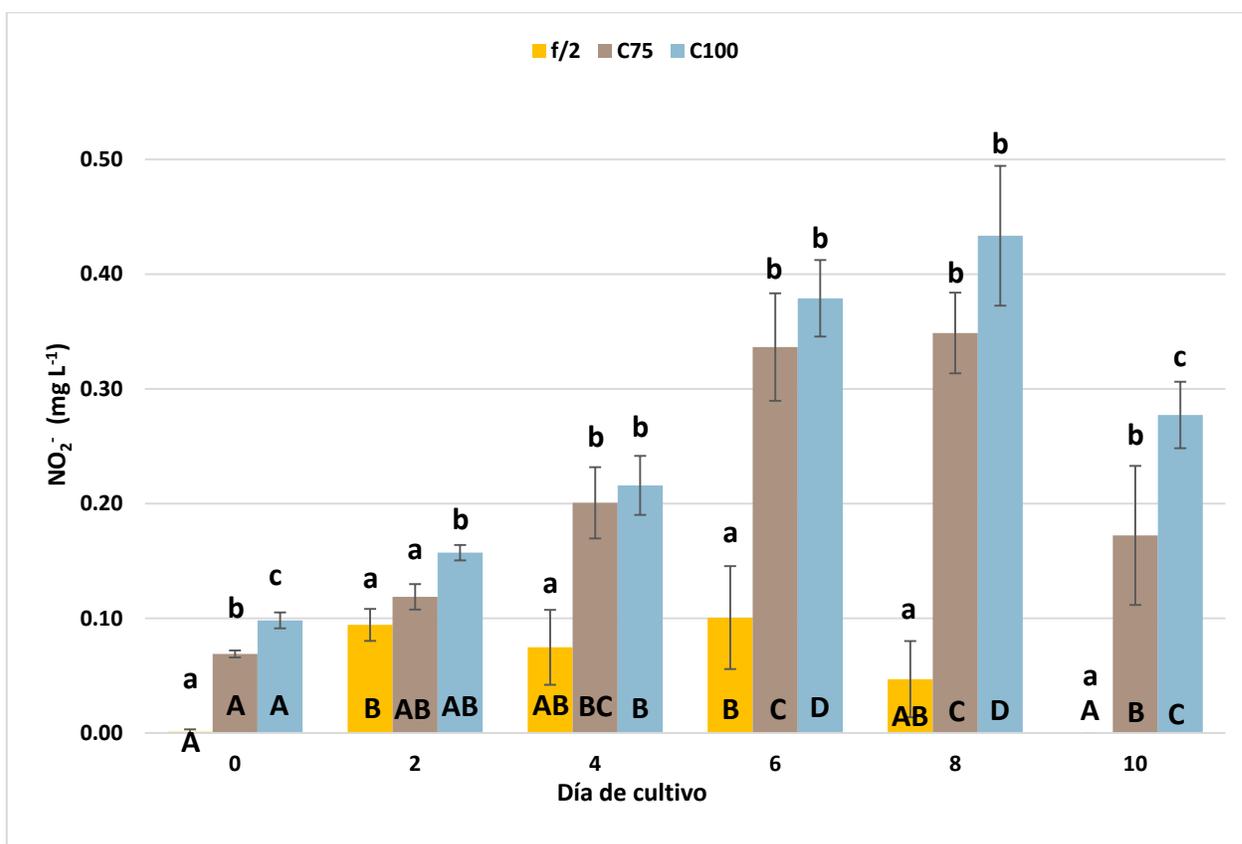


Figura 11. Concentración de nitritos (NO_2^- , mg L^{-1}) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, $a < b < c$. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, $A < B < C < D$.

Con relación al contenido de nitritos obtenidos en cada tratamiento a través del tiempo, se observó que en el caso del “f/2”, la concentración promedio significativamente ($p < 0.05$) más baja se presentó entre los días cero y diez con 0 mg L^{-1} , mientras que la significativamente ($p < 0.05$) más alta entre los días dos y seis con 0.09 mg L^{-1} , por otro lado, los días cuatro y ocho no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) contra los días ya mencionados. En el caso del tratamiento C75, en los días seis y ocho es donde las concentraciones fueron más elevadas ($p < 0.05$), con un promedio de 0.35 mg L^{-1} , y finalmente, en C100 se observó una tendencia de incremento de los días dos al ocho, con las concentraciones más altas ($p < 0.05$) en los días seis y ocho, con un promedio de 0.41 mg L^{-1} y una posterior disminución en el día diez, con 0.28 mg L^{-1} (31.7 % de descenso). Con respecto a la eficiencia de remoción de nitrito residual, el tratamiento control “f/2” mostró remoción desde los días cuatro al diez, en este último día, la remoción fue del 100% (Tabla 6); por otra parte, los tratamientos con efluente del cultivo de camarón (C75 y C100) mostraron

remoción únicamente al final del cultivo (día 10) el cual fue de 54% para C75 y del 36% para el C100. La mayor remoción de nitritos ($p < 0.05$) fue obtenida en el tratamiento “f/2” en los días ocho y diez, los días restantes no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos.

Tabla 6 Eficiencia de remoción de nitritos (NO_2^- , %) por *Porphyridium cruentum* cultivada en diferentes tratamientos, medio “f/2” y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).

Medio / Día	Eficiencia de remoción acumulada de NO_3^- (%)					
	0	2	4	6	8	10
f/2	0	0	21.0 ± 27.9	18.0 ± 24.5	59.0 ± 29.4 ^b	100.0 ^b
C75	0	0	0	0	6.0 ± 9.79 ^a	54.0 ± 14.2 ^a
C100	0	0	0	0	0 ^a	36.0 ± 2.3 ^a

*Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos, a<b.

3.2.4 Fosfatos (PO_4^{3-})

Como se observa en la figura 12, las concentraciones residuales de fosfatos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. En el día cero, el tratamiento control “f/2” mostró significativamente una mayor concentración de fosfatos (0.72 mg L^{-1}) seguido por el tratamiento C100 (0.60 mg L^{-1}) y con la menor concentración el C75 (0.42 mg L^{-1}) ($p < 0.05$), de igual forma al día dos “f/2” mantuvo una mayor concentración (0.45 mg L^{-1}) que el tratamiento C100 (0.27 mg L^{-1}) y con una concentración significativa más baja el tratamiento C75 (0.12 mg L^{-1}) ($p < 0.05$). En el día cuatro no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el tratamiento “f/2” y C100 (promedio: 0.27 mg L^{-1}), ambos tratamientos mostraron tener una concentración de fosfatos significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del tratamiento C75 (0.11 mg L^{-1}). Al día seis no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), concentración promedio 0.02 mg L^{-1} ; este nutriente se agotó en los días subsecuentes, por lo que dejó de detectarse a partir del día ocho.

Respecto a las concentraciones de cada tratamiento entre los diferentes días de cultivo, se observó que “f/2” tuvo los valores más altos en el día inicial (día 0: 0.72 mg L^{-1}), seguido del día dos (0.45 mg L^{-1}) y cuatro (0.31 mg L^{-1}), mientras que en C75 la mayor concentración también fue en el día 0 (0.42 mg L^{-1}) y en los días dos y cuatro se tuvieron valores similares (promedio 0.12 mg L^{-1}) ($p > 0.05$). Asimismo, en C100 se observó la misma tendencia a disminuir a través del tiempo, con la concentración más alta en el inicio del cultivo (día 0), con 0.60 mg L^{-1} , e igualmente, entre los días dos y cuatro no se observaron diferencias

significativas (promedio: 0.25 mg L⁻¹). En los tres tratamientos la concentración más baja fue en el día seis, con un promedio de 0.02 mg L⁻¹.

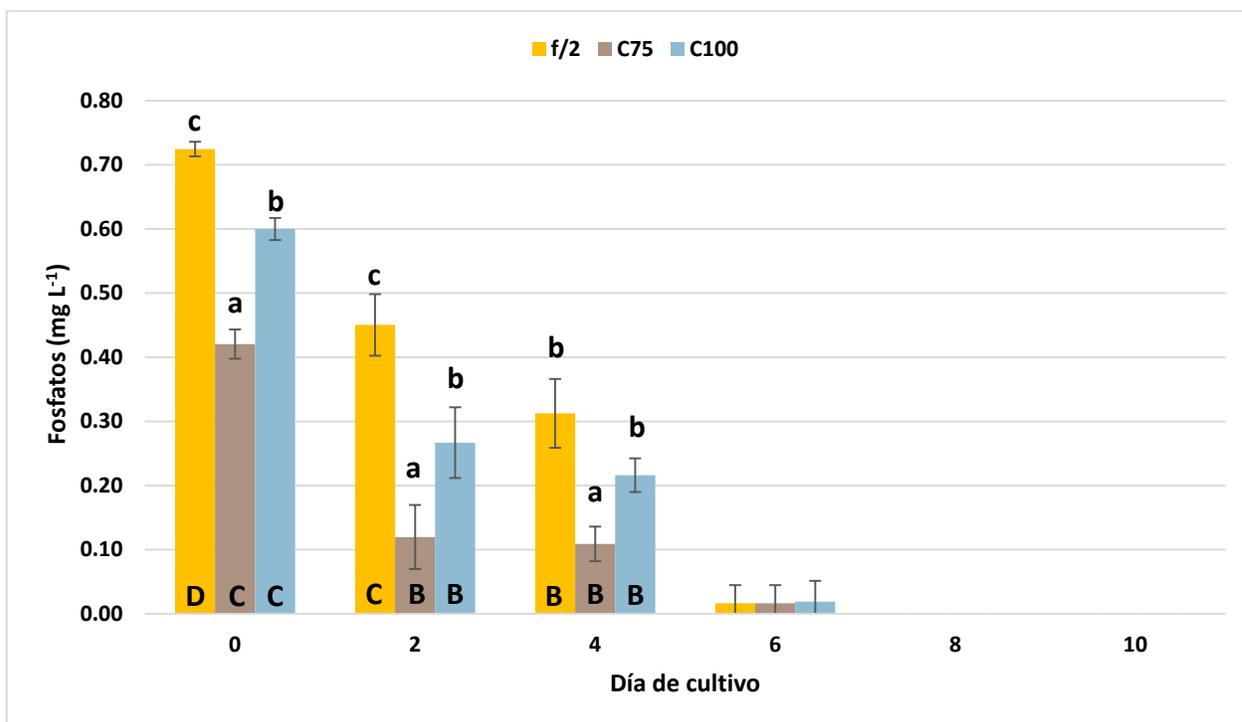


Figura 12. Concentración promedio de fosfatos (mg L⁻¹) residual en el cultivo de *Porphyridium cruentum* cultivada en tres tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente). Las barras corresponden al error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día, a<b<c. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre días de un mismo tratamiento, A<B<C<D.

Con relación a la eficiencia de remoción de fosfato residual (Tabla 7), En el día seis la eficiencia de remoción acumulada fue entre el 96 al 98% en todos los tratamientos, y al día ocho se observó una remoción del 100% en los tres tratamientos, en ambos días no se observaron diferencias significativas (p>0.05) entre tratamientos sobre la eficiencia de remoción de fosfatos residuales.

Tabla 7 Eficiencia de remoción de fosfatos (PO₄³⁻, %) por *Porphyridium cruentum* cultivada en diferentes tratamientos, medio "f/2" y diferentes concentraciones de agua del efluente del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), al 75% y 100% (C75 y C100, respectivamente).

Medio / Día	Eficiencia de remoción acumulada de PO ₄ ³⁻ (%)				
	0	2	4	6	8
f/2	0	38 ± 5.63 ^a	57 ± 6.73 ^a	98 ± 3.85	100
C75	0	71 ± 13.37 ^b	74 ± 7.38 ^b	96 ± 7.08	100
C100	0	55 ± 9.27 ^{ab}	64 ± 5.40 ^{ab}	97 ± 5.63	100

*Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos, a<b.

Capítulo 4. Discusión

En el desarrollo de cultivos de microalgas es importante conocer y considerar los factores que influyen directamente en el crecimiento y composición de las células, entre los principales factores están la luz, la temperatura, el pH, la salinidad, la calidad y tamaño del inóculo, así como la cantidad y calidad de los nutrientes suministrados (Abalde *et al.*, 1995). Trabajos como el que aquí se presenta, permiten conocer los factores limitantes y capacidades aprovechables sobre las diversas especies de microalgas que son de interés.

Actualmente, el interés por el uso de microalgas para fitorremediación de efluentes acuícolas ha ido en aumento, principalmente por la remoción de nutrientes, la generación de biomasa y el aprovechamiento de sus compuestos, por lo que este tema ha sido el objeto de estudio de diferentes autores (John *et al.*, 2020).

La microalga *P. cruentum* utilizada en este estudio presentó un adecuado crecimiento en los tratamientos con agua del efluente del cultivo de *L. vannamei*, con 2.79×10^6 cél ml⁻¹, estos resultados fueron comparables a los obtenidos en el tratamiento control "f/2" con 2.77×10^6 cél ml⁻¹. Otros autores han reportados valores de 4.3 y 7.0 $\times 10^6$ cél ml⁻¹, también en volúmenes de 2 L, cabe señalar que en esos trabajos se aplicaron irradiancias de 116 y 262 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (Hernández-Herrera, s.f. y González-Muñoz, 2006, respectivamente), mientras que en el presente trabajo se utilizaron irradiancias de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, por lo que podría ser que esta diferencia en la intensidad de luz pudo ser una de las causas de la baja densidad observada en este trabajo, sin embargo, Hernández-García (2022), obtuvo biomásas similares a las de este estudio (2.7×10^6 cél ml⁻¹) pero con una irradiancia de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

En otros estudios donde se han reportado un amplio rango de irradiancias para el cultivo de *P. purpureum* y otras especies de microalgas, van desde los 11 a los 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (Friedman *et al.*, 1991; Bartual *et al.*, 2002; Sosa-Hernández *et al.*, 2019). Estos rangos tan amplios de luz han permitido identificar los efectos generados sobre las microalgas expuestas a diferentes longitudes de onda, lo que nos permite identificar las mejores irradiancias para lograr los efectos deseados sin dejar de lado otras variables que afectan de manera directa en la producción de biomasa, como ya se mencionó anteriormente.

Tras analizar el peso en los tres tratamientos, se observó que tanto el PST como el PO ($\mu\text{g ml}^{-1}$) se incrementaron a lo largo del cultivo, lo cual está relacionado con el aumento de la densidad celular (cél

ml⁻¹). Sin embargo, cuando estos pesos fueron expresados en pg cel⁻¹, se observó una relación inversa, esta tendencia de reducción del peso en *P. cruentum* también fue observada por González-Muñoz (2006) y Hernández-García (2022). Esta disminución en el peso puede estar relacionado a la disponibilidad del nitrógeno (N) y otros nutrientes en los medios de cultivo, ya que el N es uno de los elementos de estudio más importantes para las microalgas, debido a que se encuentra presente en diversos compuestos celulares, por lo que la limitación de este elemento conlleva un impacto directo sobre el tamaño y peso de las microalgas (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020).

Cuando el N comienza a ser limitante, la capacidad fotosintética de las microalgas comienza a decaer y la cantidad de proteína en las células también, lo que disminuye el peso de las células (Young y Beardall, 2003). Hitchcock (1982) trabajó con once especies de diatomeas y ocho especies de dinoflagelados y señaló que el incremento del contenido de proteína y el aumento de volumen de la célula, en la fase exponencial, se relacionaban con la concentración del N, además, el autor mencionó que existe una relación directa entre el volumen del plasma y el área superficial de las células, lo que permite una mayor tasa de fotosíntesis y un aumento en la cantidad de clorofila. El PO obtenido en los tres tratamientos fueron similares a lo reportado por Hernández-García (2022), los cuales se mantuvieron dentro de los rangos de 100 a 250 pg cél⁻¹.

Otro de los elementos analizados fue la ficoeritrina, en la que se observó un descenso en el contenido de este pigmento a partir del día 8 de cultivo en dos de los tratamientos empleados (“f/2” y C100). Algunos autores han demostrado que la disminución de nutrientes provoca la disminución del contenido de pigmentos en las microalgas y por ende se limita la capacidad fotosintética (Boussiba y Richmond, 1980; Bartual *et al.*, 2002), por lo que la disminución en el contenido de ficobiliproteínas como la ficoeritrina puede verse afectada por la limitación del nitrógeno y provocar a su vez una degradación de este tipo de pigmentos, lo que abre la posibilidad de que en determinadas situaciones las ficobiliproteínas adquieran un rol como reservorios de nitrógeno, lo que permitiría el mantenimiento y crecimiento de las células bajo la limitación de este nutriente (Yamanaka y Glazer, 1980; Bartual *et al.*, 2002; Forchhammer y Schwarz, 2019), este podría ser el caso que se observa principalmente en el tratamiento C100 (Anexo F) donde podemos ver una tendencia de disminución en la concentración de este pigmento que va del día ocho al día diez, que coincide con la disminución en la concentración residual de nitrógeno en este tratamiento; sin embargo, este comportamiento no se observó en los otros dos tratamientos, aunque cabe destacar que si bien el tratamiento “f/2” no mostró diferencias significativas en la concentración a lo largo del cultivo, cabe la posibilidad que esta tendencia en la disminución de pigmento si se hubiere observado con más días de cultivo basándonos en la tendencia de los últimos días de cultivo.

Por otro lado, el análisis del contenido de ficoeritrina mostró que el medio control "f/2" registró la mayor concentración ($13.7 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$), mientras que los valores obtenidos en los tratamientos con efluente del cultivo de camarón se mantuvieron más bajos, siendo los valores máximos alcanzados en estos de 10.1 y $8.7 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ (en C100 y C75, respectivamente). Estos contenidos fueron mayores a los reportados por Friedman *et al.* (1991), González-Muñoz (2006) y Hernández-Herrera (s.f.), quienes obtuvieron promedios de 2 a $7 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ de ficoeritrina en cultivos con medio "f/2", pero menores al obtenido por Reboloso-Fuentes *et al.* (2000) de $28.5 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ en una irradiancia de $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Esta concentración más alta, vista por el anterior autor, podría estar relacionado a la intensidad de luz, como lo mencionan Sosa-Hernández y colaboradores (2019), quienes observaron que la producción de ficoeritrina en *P. purpureum* a baja intensidad de luz ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fue de 11.24 mg L^{-1} , mientras que con una intensidad alta de luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) el contenido fue mayor (14.66 mg L^{-1}), concluyendo que las microalgas generan más pigmento en intensidades de luz altas con el objetivo de captar la mayor cantidad de fotones posibles.

Sin embargo, en un trabajo realizado por Rhiel *et al.* (1985) donde utilizaron la microalga *Cryptomonas maculata*, observaron que en condiciones de irradiancia de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (alta) se obtuvieron concentraciones de ficoeritrina de 1 a $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que en irradiancias de $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (baja) obtuvieron concentraciones de $25 \mu\text{g ml}^{-1}$, concluyendo que en irradiancias bajas la concentración de ficoeritrina aumentaba.

Este mismo comportamiento fue observado en *Pyrenomonas salina* por Lewitus y Caron (1990), ya que cuando utilizaron una irradiancia baja ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se obtuvo una concentración de ficoeritrina de $5 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ mientras que a una intensidad alta ($325 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se presentó una concentración más baja de este pigmento ($3 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$). Esto se ve reforzado en el trabajo realizado por Bartual *et al.* (2002), quienes cultivaron *Rhodomonas salina* en distintas irradiancias: 11, 33, 75, 260 y $320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, siendo la irradiancia de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en donde se observó la concentración más alta de ficoeritrina, mientras que en las irradiancias más elevadas esta concentración fue mucho menor (entre 1.13 y $1.42 \text{ pg c\acute{e}l}$).

Lo antes mencionado podría ser más consistente con los resultados obtenidos en este trabajo y explicaría el alto contenido de ficoeritrina, así como la baja densidad celular observada, pues en estos mismos trabajos se reporta que en las irradiancias más altas obtuvieron una biomasa mayor pero una menor concentración del pigmento y por el contrario, a una irradiancia menor la concentración de pigmentos aumentó, mientras que la biomasa fue menor. Un punto que destacar de estos trabajos es que cada autor

reporta diversas irradiancias que funcionaron con especies diferentes, por lo tanto, es recomendable identificar en futuros trabajos las irradiancias que puedan ejercer un mejor efecto sobre *P. cruentum*.

Con respecto al contenido del exopolisacárido sulfatado (EPS), la concentración máxima registrada en este estudio fue de 3.3 mg ml⁻¹ en promedio de los tres tratamientos, esto fue cercano a lo obtenido por Hernández-García (2022), el cual reportó un contenido de 2.84 mg ml⁻¹ también en *P. cruentum*, sin embargo, fue mucho mayor al obtenido por Medina-Cabrera *et al.* (2021), quienes registraron un contenido promedio de solo 0.17 y 0.21 mg ml⁻¹ en *P. purpureum* y *P. sordidum*, respectivamente. Las diferencias en el contenido de EPS pueden estar relacionadas a las diferentes condiciones de cultivo, tanto en el medio de cultivo como en la intensidad de luz empleada.

Según Babiak y Krzeminska (2021), son diversos los factores que influyen en la producción de EPS y se suelen relacionar las fases finales de crecimiento (estacionaria y muerte) en condiciones de privación de N que alteran la relación de C:N (carbono y nitrógeno) y la síntesis de EPS. Algunos autores han indicado que los niveles de N influyen en la concentración de EPS de manera inversa, de tal manera que cuando el N comienza a ser limitante entrando a la fase estacionaria, el contenido de EPS aumenta (Medina-Cabrera *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2002).

Sin embargo, en este trabajo no se observó dicho comportamiento y, en cambio, el contenido de EPS se mantuvo similar durante todo el periodo del cultivo, esto mismo fue observado por Hernández-García (2022). Babiak y Krzeminska (2021) sugieren que los valores de pH, determinados por la fuente de nitrógeno pueden influir en la producción de EPS y mencionan que, en un cultivo normal, la producción de EPS comienza en la fase estacionaria, cuando los valores de pH se ven elevados (8-9) por el envejecimiento natural del cultivo. En el trabajo realizado por Lupi *et al.* (1994), valores de pH de 5 y 7 en el cultivo de *Botryococcus braunii* influyeron en una mayor producción de EPS en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

Por lo que si bien, en este trabajo el cultivo comenzó a verse limitado en N para el último día, este se encontraba en fase de crecimiento lento y no llegó a la fase estacionaria, aunque el pH se encontraba entre valores de 8 y 9. Se han sugerido diversas formas para aumentar la producción de EPS por parte de las microalgas, según Medina-Cabrera *et al.* (2020) dividir el cultivo en dos etapas, una donde se genere biomasa y otra donde se aplique estrés puede ayudar a la generación de una mayor cantidad de EPS.

Las microalgas tienen la capacidad de ejercer un efecto de fitorremediación sobre cuerpos de agua con problemas de eutrofización, ya que, en estos ambientes, compuestos como el NAT, los nitratos, nitritos y fosfatos se encuentran en altas concentraciones, los cuales son aprovechados por las microalgas como sus principales nutrientes (Gregory *et al.*, 2012; Lananan *et al.*, 2014).

La concentración de nutrientes en los efluentes acuícolas puede estar entre 3-7 mg L⁻¹ de amoníaco, 2-110 mg L⁻¹ de nitratos y 2-50 mg L⁻¹ de fosfatos (John *et al.*, 2020). En este estudio, el agua proveniente del cultivo de *L. vannamei* contenía diferentes concentraciones iniciales de NAT, nitratos, nitritos y fosfatos (0.061, 51.54, 0.10 y 0.60 mg L⁻¹, respectivamente), estas concentraciones pueden variar dependiendo de diversos factores como el tipo de alimento suministrado a los organismos, las raciones alimenticias, la tasa de recambios de agua, y el tipo de sistema de cultivo. Iber y Kasan (2021) reportan concentraciones de 0.18 mg L⁻¹ y 0.60 mg L⁻¹ de amonio en sistemas intensivos y semi-intensivos, respectivamente, así como valores entre 0.20 y 0.45 mg L⁻¹ de nitritos, nitratos entre 0.213 y 1.963 mg L⁻¹ y 0.72 mg L⁻¹ de fosfatos. Algunos autores mencionan que las concentraciones de nitrógeno amoniacal no ionizado por encima de 1.5 mg L⁻¹ son tóxicas y son aceptables por debajo de 0.0125 mg L⁻¹, los valores aceptables para nitritos varían entre 0.2, 2 y 4 mg L⁻¹ dependiendo del pH, y para nitratos valores de hasta 3400 mg L⁻¹ se consideran letales (Roy *et al.*, 2010; Yusoff *et al.*, 2011).

Las concentraciones iniciales de NAT presentes en este trabajo, no parecen haber afectado de manera negativa el crecimiento de *P. cruentum* y, por el contrario, ayudó a promover su adecuado crecimiento. La tolerancia de las microalgas a las concentraciones tóxicas de nitrógeno, normalmente en forma de NAT, varía entre especies, se han reportado concentraciones de tolerancia de hasta 1000 mg L⁻¹ en *Chlorella vulgaris*, mientras que para *Neochloris oleoabundans* y *Dunaliella tertiolecta* de 2.3 y 3.3 mg L⁻¹, respectivamente (Tam y Wong, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2016).

Las concentraciones iniciales de NAT en este trabajo fueron más elevadas en los tratamientos C75 y C100 (0.047 y 0.061 mg L⁻¹, respectivamente), comparados con el medio control "f/2" (0.033 mg L⁻¹), lo cual era de esperarse ya que la fuente principal de nitrógeno del medio "f/2" son los nitratos, mientras que fuentes como el NAT y nitritos no están presentes; aun así, se observó cierta concentración inicial de NAT en este medio, dicho compuesto pudo estar presente en el agua de mar empleada para la preparación del medio "f/2". Respecto al aprovechamiento del NAT, este fue más notable en los tratamientos con efluente de camarón; la eficiencia de eliminación en estos tratamientos fue del 72% y 76% (C100 y C75, respectivamente), mientras que en el medio "f/2" fue del 25%. Estos valores estuvieron por debajo a los obtenidos por Luo *et al.* (2016) y Cai *et al.* (2013) con eficiencias de hasta el 90-100% en *Coelastrella* sp. y

84-96% en *Arthrospira* sp. La marcada disminución del NAT en los tratamientos C75 y C100 en los días iniciales, coincide con el inicio de la fase exponencial. A su vez, se sabe de la preferencia de las microalgas por este nutriente ya que no requiere un gasto alto de energía para la reducción, asimilación y aprovechamiento (Luo *et al.*, 2016); no obstante, la baja concentración de NAT provocó que los nitratos pasaran a ser rápidamente la fuente principal de N. En cambio, en el tratamiento “f/2” se observó una concentración constante y similar de NAT durante todo el cultivo; esto se puede explicar por la posible aparición de bacterias nitrificantes. Un comportamiento similar se observó cuando se analizaron los nitritos, pero en esta ocasión en los tres tratamientos.

Algunos estudios indican que la concentración de las diferentes fuentes de N (NAT, nitratos y nitritos), se ven afectadas por procesos de evaporación, nitrificación y desnitrificación (Zhou *et al.*, 2017; Arashiro *et al.*, 2020). Andreotti *et al.* (2020), observaron la presencia de bacterias nitrificantes en el cultivo de *Tetraselmis suecica* en aguas residuales de acuicultura, aun cuando la tasa de nitrificación era baja. Se debe considerar que, aunque en este estudio se tomaron las medidas pertinentes para evitar la contaminación de los cultivos, este experimento no se desarrolló de manera axénica (libre de bacterias), por lo que se debe tener en cuenta la carga bacteriana que provienen de los inóculos de microalgas cuando estos no son axénicos. En este trabajo no se consideró el aporte de posibles bacterias nitrificantes que pudieran haber estado presentes en los cultivos, por lo que sería interesante realizar un análisis para detectar la carga de bacterias nitrificantes y el aporte de estos organismos en el desarrollo de cultivos que tengan el objetivo de medir la remoción de compuestos nitrogenados.

El nitrato fue la principal fuente de N de los tres tratamientos, y se observó un mejor aprovechamiento de este nutriente en el medio control “f/2”, con una eficiencia de eliminación del 94%; aun así, el aprovechamiento de los nitratos en los tratamientos C75 y C100 fue bastante bueno, por encima del 85%. Si bien no hubo un decremento pronunciado de la concentración de nitratos en el inicio de la fase exponencial de ningún tratamiento, no se registró algún aumento en la concentración de los nitratos como ocurrió con el NAT y los nitritos, esto puede indicar que la concentración baja de estos últimos dos nutrientes fue limitante, permitiendo un mejor aprovechamiento de los nitratos. La utilización de este nutriente por parte de las microalgas fue similar a los obtenido por Askari Hesni *et al.* (2019) y Arashiro *et al.* (2020), con el 81 y 98% de eficiencia en la remoción final de nitratos por *Chlorella vulgaris* y *P. purpureum*, respectivamente.

En el caso de los nitritos la eficiencia de remoción fue baja para los tratamientos C75 y C100 (51% y 36% respectivamente), mientras que el tratamiento “f/2” tuvo una eficiencia del 100%; otros autores reportan

eficiencia de eliminación final de nitritos del 89.6% por parte de *Picochlorum maculatum* (Dinesh-Kumar *et al.*, 2016). Sin embargo, como anteriormente se mencionó, se observó un incremento en el contenido de nitritos en los tres tratamientos, el cual se puede explicar por procesos de nitrificación y descomposición de la biomasa (Andreotti *et al.*, 2020). Como se analizó previamente, otra consideración es la baja concentración de nitritos comparada con los nitratos, con valores que no superaron los 0.5 mg L⁻¹ en los tratamientos con efluente de camarón y 0.1 mg L⁻¹ en medio “f/2”, estos valores máximos alcanzados en los tratamientos C75 y C100 se dieron pocos días antes de dar por terminado el experimento, esto podría explicar el bajo aprovechamiento de este nutriente.

Por último, el análisis de los fosfatos mostró una eficiencia de eliminación del 100% al séptimo día en los tres tratamientos, estos valores son más altos a los observados en otros estudios, donde la eficiencia variaba entre 57 y 87% (Cai *et al.*, 2013; Dinesh-Kumar *et al.*, 2016; Askari Hesni *et al.*, 2019), estos contrastes pueden ser debido a las diferentes condiciones de cultivo en cada caso. El fósforo incorporado por las microalgas a partir de los fosfatos es de suma importancia ya que hablamos de un macronutriente fundamental para el correcto crecimiento de las microalgas pues este es empleado en casi todas las funciones celulares, desde biosíntesis de nucleótidos, transferencia de energía, procesos de fosforilación, etc.; por lo que la limitación de este nutriente puede ser a su vez influir negativamente en el crecimiento de estas (Becker, 1994).

Wang *et al.* (2021), mencionan que la asimilación de los fosfatos está dada por la presencia del N en cantidades suficientes para la formación de proteínas, en este sentido la relación del N y el P (N/P) debe estar dentro un rango adecuado, esta relación dependerá de cada cepa (Cai *et al.*, 2013). En el estudio realizado por Sosa-Hernández *et al.* (2019), con *P. purpureum*, se emplearon diferentes relaciones de N/P (11:1, 33:1 y 66:1) en una irradiancia de 30 μmol m⁻² s⁻¹, y obtuvieron las mejores biomásas en los tratamientos con relaciones de N:P de 11:1 (173.2 mg L⁻¹ d⁻¹) y los rendimientos más bajos en las relaciones de 66:1 (138.6 mg L⁻¹ d⁻¹). La relación empleada en este trabajo fue de 60:1 (111.55 mg L⁻¹ d⁻¹) en promedio, muy por encima del 11:1 y muy similar a 66:1 aplicada por el anterior autor.

La relación de N:P no fue considerada en este experimento debido a que los medios de cultivo se emplearon de forma directa y solo se aplicó dilución al agua de efluente del cultivo de camarón para obtener las concentraciones a evaluar, por lo tanto, esta relación tan alta de nitrógeno con respecto al fosfato pudo haber provocado lo que se observó durante el cultivo, pues la concentración de fosfato residual disminuyó rápidamente, ocasionando que al día 6 fuera utilizado por las microalgas casi en su totalidad, por lo que en los días posteriores ya no se contaba con este nutriente.

En el anexo A se puede observar un gráfico simplificado donde se comparan las distintas fuentes de nutrientes a lo largo del cultivo, en él se muestra que aún sin fosfato, las concentraciones de las diferentes fuentes de nitrógeno, principalmente los nitratos, disminuyeron, esto puede deberse a la presencia de gránulos de reserva de fosfatos en las microalgas (Vela *et al.*, 2007). El aprovechamiento de estas reservas pudiera explicar lo observado en los días posteriores a su terminación, donde el aprovechamiento del N residual se siguió dando. En cultivos donde el fósforo pasa a ser limitante, se ha observado una tendencia a la acumulación de lípidos por parte de las microalgas, mientras que los carbohidratos, proteínas y clorofila comienzan a decrecer (Becker, 1994). Si bien en este trabajo no se cuantificaron los contenidos de estos compuestos, no se puede descartar el comportamiento antes mencionado.

Capítulo 5. Conclusiones

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que la biomasa producida de *P. cruentum* en los tratamientos con agua del efluente del cultivo de camarón (75% y 100%) fue similar a la generada en el medio "f/2", por lo que estas concentraciones son adecuadas para la producción de biomasa de esta microalga, así como para la síntesis del pigmento ficoeritrina. En cuanto a la generación de exopolisacáridos, con ambas concentraciones del efluente (75% y 100%) se obtuvieron resultados similares al control por lo que ambas son aplicables para este objetivo. De igual forma, este trabajo demostró que *P. cruentum* puede ser utilizada para ejercer un efecto de biorremediación en efluentes provenientes de la acuicultura, el aprovechamiento de las fuentes de nutrientes de estas aguas puede beneficiar o potenciar la generación de biomasa y compuestos de interés científico y económico en condiciones controladas. Se recomienda que se realicen investigaciones adicionales en el cultivo de *P. cruentum* a escalas comerciales con efluentes acuícolas.

Literatura citada

- Abalde, J., Cid, A., Torres, E., Herrero, C. & Fidalgo, P. P. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. In Universidad de La Coruña & Servicio de publicaciones (Eds.). <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Adams, V. D. (2017). Methods for the determination of inorganic and nonmetals. Water and wastewater examination manual. <https://doi.org/10.1201/9780203734131>
- Agraz-Hernández, C. M. (1999). Reforestación experimental de manglares en ecosistemas lagunares estuarinos de la costa noroccidental de México [Tesis de Doctorado en Ciencias Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/5119/1/1080124453.PDF>
- APHA (American Public Health Association). (1999). Standard methods for the examination of water and wastewater. In L. S. Clesceri, A. E. Greenberg & A. D. Eaton (Eds) (20th ed.)
- Andreotti, V., Chindris, A., Brundu, G., Vallainc, D., Francavilla, M. & García, J. (2017). Bioremediation of aquaculture wastewater from *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) with different microalgae species. *Chemistry and Ecology*, 33(8), 750–761. <https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1378351>
- Andreotti, V., Solimeno, A., Rossi, S., Ficara, E., Marazzi, F., Mezzanotte, V. & García, J. (2020). Bioremediation of aquaculture wastewater with the microalgae *Tetraselmis suecica*: Semi-continuous experiments, simulation and photo-respirometric tests. *Science of The Total Environment*, 738 (139859). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139859>
- Arashiro, L. T., Boto-Ordóñez, M., Van Hulle, S. W. H., Ferrer, I., Garfí, M. & Rousseau, D. P. L. (2020). Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 303 (122894). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122894>
- Arredondo-Figueroa, J. L. (2002). El cultivo de camarón en México, actualidades y perspectivas. <https://cesasin.mx/wp-content/uploads/2017/12/Cam-Actualidades-en-el-cultivo-de-camarao%CC%81n.pdf>
- Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D. & Cordero-Esquivel, B. (2017). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In B.O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savín, M. Arce-Montoya y G. A. Gómez-Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (2nd ed.) (pp. 21-29). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Askari-Hesni, M., Aliakbar Hedayati, S., Qadermarzi, A., Pouladi, M., Zangiabadi, S., Naqshbandi, N. & Hesni, A. M. (2019). Comparison ability of algae and nanoparticles on nitrate and phosphate removal from aquaculture wastewater. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 6(3), 171–177. <https://doi.org/10.15171/EHEM.2019.19>
- Babiak, W., & Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: a review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, 14(13), 4007. <https://doi.org/10.3390/en1413400>
- Bartual, A., Lubián, L. M., Gálvez, J. A. & Niell, F. X. (2002). Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas*

- salina* (Wislouch) (Cryptophyceae). *Ciencias Marinas*, 28(4), 381–392. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48028406>
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. New York. 293.
- Bennett, A. & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419–435. <https://doi.org/10.1083/JCB.58.2.419>
- Bermeo-Castillo, L. E. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en aguas residual mediante técnicas de centrifugado. Universidad Técnica Particular de Loja. <https://docplayer.es/9881046-Estudio-del-cosechado-de-cultivos-de-microalgas-en-agua-residual-mediante-tecnicas-de-centrifugado.html>
- Bernaerts, T. M. M., Kyomugasho, C., Van Looveren, N., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E. & Van Loey, A. M. (2018). Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*, 195(May), 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.001>
- Bortolini-Rosales, J.-L. & García, M. (2004). La camaronicultura en México. https://www.researchgate.net/publication/26618202_La_camaronicultura_en_Mexico
- Boussiba, S. & Richmond, A. E. (1980). C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 125(1–2), 143–147. https://www.academia.edu/24467895/C_phycocyanin_as_a_storage_protein_in_the_blue_green_alga_Spirulina_platensis
- Briggs, M. & Fox, J. (2007). *Litopenaeus vannamei* (whiteleg shrimp). Detailed Coverage of Invasive Species Threatening Livelihoods and the Environment Worldwide. *Invasive Species Compendium*. CABI. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/71097>
- Cai, T., Park, S. Y. & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Clément-Larosière, B., Lopes, F., Gonçalves, A., Taidi, B., Benedetti, M., Minier, M. & Pareau, D. (2014). Carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO₂ concentrations and light intensities. *Eng. Life Sci.*, 14: 509-519. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200212>
- Cohen, Z., Vonshak, A. & Richmond, A. (1988). Effect of environmental condition on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum* correlation to growth rate. *J. Phycol.*, 24, 328–332.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A. & Harrison, P. J. (1999). An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 11(2), 179–184. <https://doi.org/10.1023/A:1008046023487>
- Dewalt, B. R., Ramírez-Zavala, J. R., Noriega, L. & González, R. E. (2002). Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal México. <https://www.researchgate.net/publication/259285149>

- Dinesh-Kumar, S., Santhanam, P., Park, M. S. & Kim, M.-K. (2016). Development and application of a novel immobilized marine microalgae biofilter system for the treatment of shrimp culture effluent. *Journal of Water Process Engineering*, 13, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.08.014>
- DMplast (2023, Febrero 12). Variedades de camarón en México. <https://dmplast.mx/variedades-de-camaron-en-mexico/>
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. <https://doi.org/10.4060/CA9229ES>
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. FAO (Eds). <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fernández-Duarte, G., Gutiérrez-Calzado, E. & García-Reyes, M. L. (2017). Obtención de β -Ficoeritrina y su uso en la conjugación de anticuerpos murinos. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 212–228. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Forchhammer, K. & Schwarz, R. (2019). Nitrogen chlorosis in unicellular cyanobacteria – a developmental program for surviving nitrogen deprivation. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1173–1184. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14447>
- Friedman, O., Dubinsky, Z. & Arad (Malis), S. (1991). Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 105–110. https://www.academia.edu/18331095/Effect_of_light_intensity_on_growth_and_polysaccharide_production_in_red_and_blue_green_rhodophyta_unicells
- Gómez-Luna, L. M. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química XIX (2)* 3-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>
- González-Henríquez, N., Rey-Méndez, M., Pérez, Y., Bilboa, A., Pavón, N., Louzara, G. & Domínguez, R. (2015). Cultivos multitróficos: complementos a la explotación de otras especies de fuerte presencia en el mercado. https://www.researchgate.net/publication/292669002_Cultivos_multitrofos_complementos_a_la_explotacion_de_otras_especies_de_fuerte_presencia_en_el_mercado
- González-Muñoz, J. A. (2006). Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. [Tesis de Maestría en Ciencias] Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1134/1/169001.pdf>
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C. & Magan, N. (2014). Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 301–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>
- Gregory, S. P., Dyson, P. J., Fletcher, D., Gatland, P. & Shields, R. J. (2012). Nitrogen removal and changes to microbial communities in model flood/drain and submerged biofilters treating aquaculture wastewater. *Aquacultural Engineering*, 50, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.03.006>

- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Gutierrez, J., Kwan, T. A., Zimmerman, J. B. & Peccia, J. (2016). Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Research*, 19, 123–127. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.07.016>
- Han, P., Lu, Q., Fan, L. & Zhou, W. (2019). A Review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Applied Sciences*, 9(11), 2377. <https://doi.org/10.3390/app9112377>
- Hernández-García, R. (2022). Actividad del exopolisacárido sulfatado producido por la microalga *Porphyridium cruentum* sobre las bacterias *Vibrio harveyi* y *Escherichia coli*. [Tesis de Maestría en Ciencias Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.] <http://biblioteca.cicese.mx/catalogos/tesis/ficha.php?id=26194>
- Hernández-Garibay, E. (2011). Caracterización de polisacáridos sulfatados no galactanos de algas marinas y factores que influyen su composición. [Tesis de Doctorado en Ciencias Universidad Autónoma de Baja California, B.C.] <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/204/1/ENS069936.pdf>
- Hernández-Herrera, V. J. (s.f.). Evaluación de la biomasa producida por la microalga *P. cruentum* en diferentes condiciones de cultivo. Manuscrito en preparación. [Tesis de Licenciatura Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz.]
- Hernández-López, J. & Vargas-Albores, F. (2003). A microplate technique to quantify nutrients (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ and PO_4^{3-}) in seawater. *Aquaculture Research*, 34(13), 1201–1204. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2109.2003.00928.X>
- Hitchcock, G. L. (1982). A comparative study of the size-dependent organic composition of marine diatoms and dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, 4, 363–377. <http://plankt.oxfordjournals.org/>
- Iber, B. T. & Kasan, N. A. (2021). Recent advances in Shrimp aquaculture wastewater management. *Heliyon*, 7(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08283>
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). (1996). *Porphyridium cruentum*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=11460#null
- John, E. M., Sureshkumar, S., Sankar, T. V. & Divya, K. R. (2020). Phycoremediation in aquaculture; a win-win paradigm. *Environmental Technology Reviews*, 9(1), 67–84. <https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1830185>
- Khoa, T. N. D., Tao, C. T., Van Khanh, L. & Hai, T. N. (2020). Super-intensive culture of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in outdoor biofloc systems with different sunlight exposure levels: Emphasis on commercial applications. *Aquaculture*, 524 (735277). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735277>
- Kishi, M., Takee, H., Kawai, M., Nagao, N. & Toda, T. (2018). Sequential high rate algal ponds operation for enhanced treatment of organic wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 39, 835–842. [https://doi.org/10.22438/jeb/39/5\(SI\)/2](https://doi.org/10.22438/jeb/39/5(SI)/2)

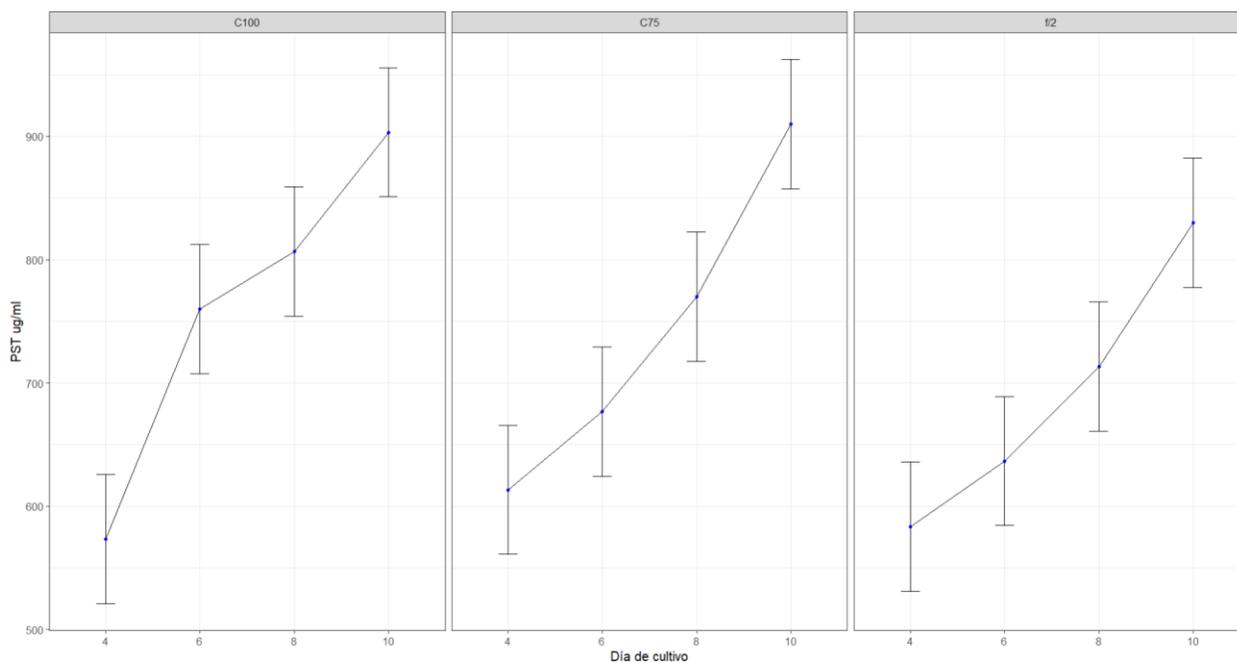
- Lananan, F., Abdul Hamid, S. H., Din, W. N. S., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A. & Endut, A. (2014). Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95(PA), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.013>
- Lewitus, A. & Caron, D. (1990). Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition, and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Marine Ecology Progress Series*, 61, 171–181. <https://doi.org/10.3354/MEPS061171>
- Lezama-Cervantes, C., Paniagua-Michel, J. de J. & Zamora-Castro, J. (2010). Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(1), 129–142. <https://doi.org/10.3856/vol38-issue1-fulltext-12>
- Lupi, F. M., Fernandes, H. M. L., Tomé, M. M., Sá-Correia, I., & Novais, J. M. (1994). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and microbial technology*, 16(7), 546-550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90116-3)
- Luo, L., He, H., Yang, C., Wen, S., Zeng, G., Wu, M., Zhou, Z. & Lou, W. (2016). Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology*, 216, 135–141. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.05.059>
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez Porchas, M. & Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3), 181–196. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Medina-Cabrera, E. V., Gansbiller, M., Rühmann, B., Schmid, J. & Sieber, V. (2021). Rheological characterization of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 253 (117237). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117237>
- Medina-Cabrera, E. V., Rühmann, B., Schmid, J. & Sieber, V. (2020). Characterization and comparison of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Research*, 49 (101931). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101931>
- Medina-Cabrera, E. V., Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2020). Optimization of growth and EPS production in two *Porphyridium* strains. *Bioresource Technology Reports*, 11 (100486). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100486>
- Meril, D., Piliyan, R., Perumal, S., Sundarraj, D. K. & Binesh, A. (2022). Efficacy of alginate immobilized microalgae in the bioremediation of shrimp aquaculture wastewater. *Process Biochemistry*, 122, 196–202. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2022.08.030>
- Miranda-Baeza, A., Rivas Vega, M. E., Lizárraga Armenta, J., Martínez Córdova, L. R., López Elías, J. A., Ayala Yocupicio, S. E., Sandoval Muy, I. & Sánchez Romero, A. (2011). Acuicultura multitrófica, una opción para el uso integral de los recursos naturales. In L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, D. A. Villarreal-Cavazos, J. , Gamboa-Delgado, & L. Hernández-Hernández (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio*

- Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre (pp. 117–142). San Nicolás de los Garza, N.L., México. https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/XI/archivos/6-miranda.pdf
- Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C. & Marco, E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. pcc 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia*, 27(7), 373–378. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002000700007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27(C), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nasir, N. M., Bakar, N. S. A., Lananan, F., Abdul Hamid, S. H., Lam, S. S. & Jusoh, A. (2015). Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting. *Bioresource Technology*, 190, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.023>
- Ni, M., Yuan, J., Zhang, L., Hua, J., Rong, H. & Gu, Z. (2021). In- situ and ex- situ purification effect of ecological ponds of *Euryale ferox* Salisb on shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 540 (736678). <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736678>
- Olguín, E. J. & Sánchez-Galván, G. (2012). Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, 30(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2012.05.020>
- Reboloso-Fuentes, M. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345–353. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00101-1)
- Rhiel, E., Mörschel, E. & Wehrmeyer, W. (1985). Correlation of pigment deprivation and ultrastructural organization of thylakoid membranes in *Cryptomonas maculata* following nutrient deficiency. *Protoplasma*, 129, 62–73.
- Roy, D., Hassan, K. & Boopathy, R. (2010). Effect of carbon to nitrogen (C:N) ratio on nitrogen removal from shrimp production waste water using sequencing batch reactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 1105–1110. <https://doi.org/10.1007/S10295-010-0869-4>
- Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., Fernando Bautista, L., González-Fernandez, C. & Gouveia, L. (2020). Cultivation of microalgae and cyanobacteria: Effect of operating conditions on growth and biomass composition. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122834>
- Servel, M. O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L. & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36(3), 691–693. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8)
- Soeprbowati, T. R. & Hariyati, R. (2013). Bioaccumulation of Pb, Cd, Cu, and Cr by *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli. *International Journal of Marine Science*. <https://doi.org/10.5376/IJMS.2013.03.0027>

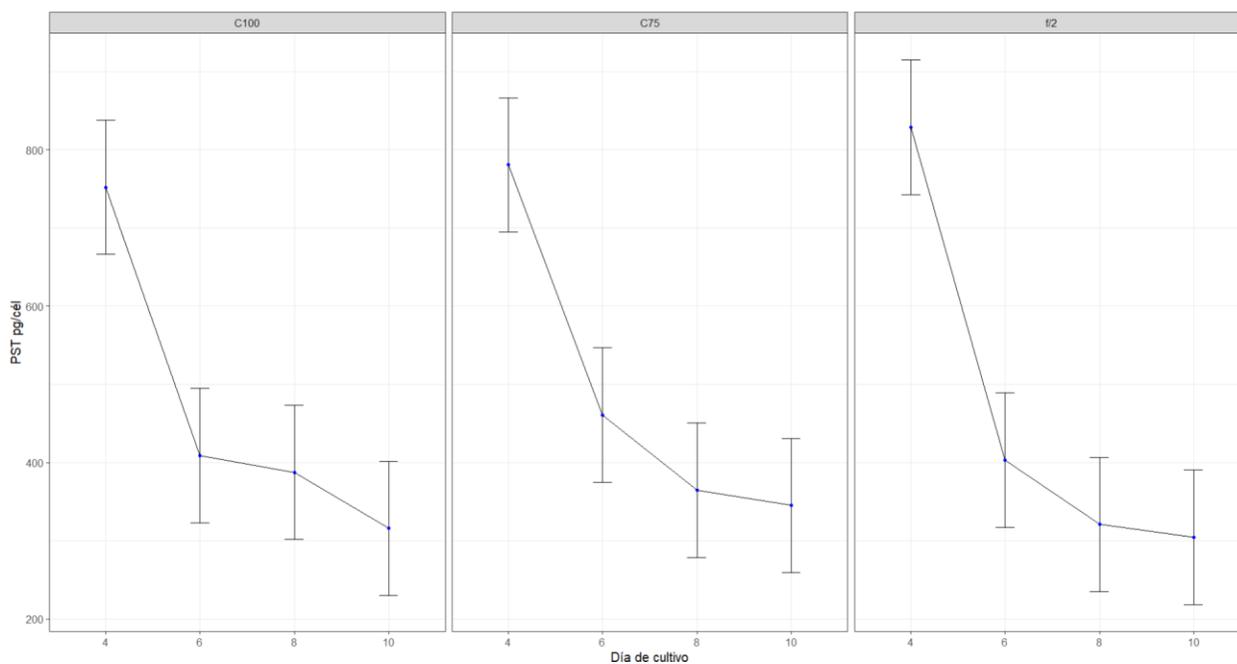
- Sorokin, C. (1973). Dry weigh, packed cell volume and optical density. In J. R. Stein (Ed.), Handbook of phyiological methods. Culture methods and growth measurements. (pp. 321–344).
- Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarías, C., Rostro-Alanís, M., de la Cruz, R., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Grunewald, C. F., Llewellyn, C. A., Olgúin, E. J., Lovitt, R. W., Iqbal, H. M. N. & Parra-Saldívar, R. (2019). Light intensity and nitrogen concentration impact on the biomass and phycoerythrin production by *Porphyridium purpureum*. Marine Drugs 2019, Vol. 17, Page 460, 17(8), 460. <https://doi.org/10.3390/MD17080460>
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. https://epic.awi.de/id/eprint/39262/1/Strickland-Parsons_1972.pdf
- Tam, N. F. Y. & Wong, Y. S. (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology, 57(1), 45–50. https://www.academia.edu/57957414/Effect_of_ammonia_concentrations_on_growth_of_Chlorella_vulgaris_and_nitrogen_removal_from_media
- Tsikis, D. (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. Free Radical Research, 39(8), 797–815. <https://doi.org/10.1080/10715760500053651>
- Ulusoy-Erol, H. B., Menegazzo, M. L., Sandefur, H., Gottberg, E., Vaden, J., Asgharpour, M., Hestekin, C. N. & Hestekin, J. A. (2020). *Porphyridium cruentum* Grown in Ultra-Filtered Swine Wastewater and Its Effects on Microalgae Growth Productivity and Fatty Acid Composition. Energies, 13(12), 3194. <https://doi.org/10.3390/en13123194>
- Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes, T., Fillat, M. F. & Peleato, L. (2007). Las microcistinas. Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza, 62, 135–146.
- Velea, S., Ilie, L. & Filipescu, L. (2011). Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: light and sodium bicarbonate. UPB, Scientific Bulletin, 73(4). https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/full31795.pdf
- Viegas, C., Gouveia, L., & Gonçalves, M. (2021). Aquaculture wastewater treatment through microalgal. Biomass potential applications on animal feed, agriculture, and energy. Journal of Environmental Management, 286 (112187). <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112187>
- Wang, H., Qi, M., Bo, Y., Zhou, C., Yan, X., Wang, G., & Cheng, P. (2021). Treatment of fishery wastewater by co-culture of *Thalassiosira pseudonana* with *Isochrysis galbana* and evaluation of their active components. Algal Research, 60 (102498). <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102498>
- Welcomme, R. I., & Barg, U. (1999). Desarrollo de la Acuicultura. In FAO (Ed.), Directrices técnicas de la FAO para la pesca responsable (p. 54). <https://www.fao.org/3/W4493S/w4493s00.htm#Contents>
- Yamanaka, G., & Glazer, A. N. (1980). Dynamic Aspects of Phycobilisome Structure Phycobilisome Turnover During Nitrogen Starvation in *Synechococcus* sp. Arch. Microbiol, 124, 39–47. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00407026.pdf>
- Young, E. B., & Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. Journal of Phycology, 39(5), 897–905. <https://doi.org/10.1046/J.1529-8817.2003.03042.X>

- Yusoff, F. M., Sanjoy Banerjee, •, Khatoon, H., & Shariff, M. (2011). Biological approaches in management of nitrogenous compounds in aquaculture Systems. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*.
- Zhao, W., Fang, H. H., Liu, Z. Z., Chen, J. M., Zhang, C. W., Gao, B. Y., & Niu, J. (2021). Responses in growth performance, enzymatic activity, immune function and liver health after dietary supplementation of *Porphyridium* sp. in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture Nutrition*, 27(3), 679–690. <https://doi.org/10.1111/anu.13214>
- Zhou, W., Li, Y., Gao, Y., & Zhao, H. (2017). Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 245, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.160>

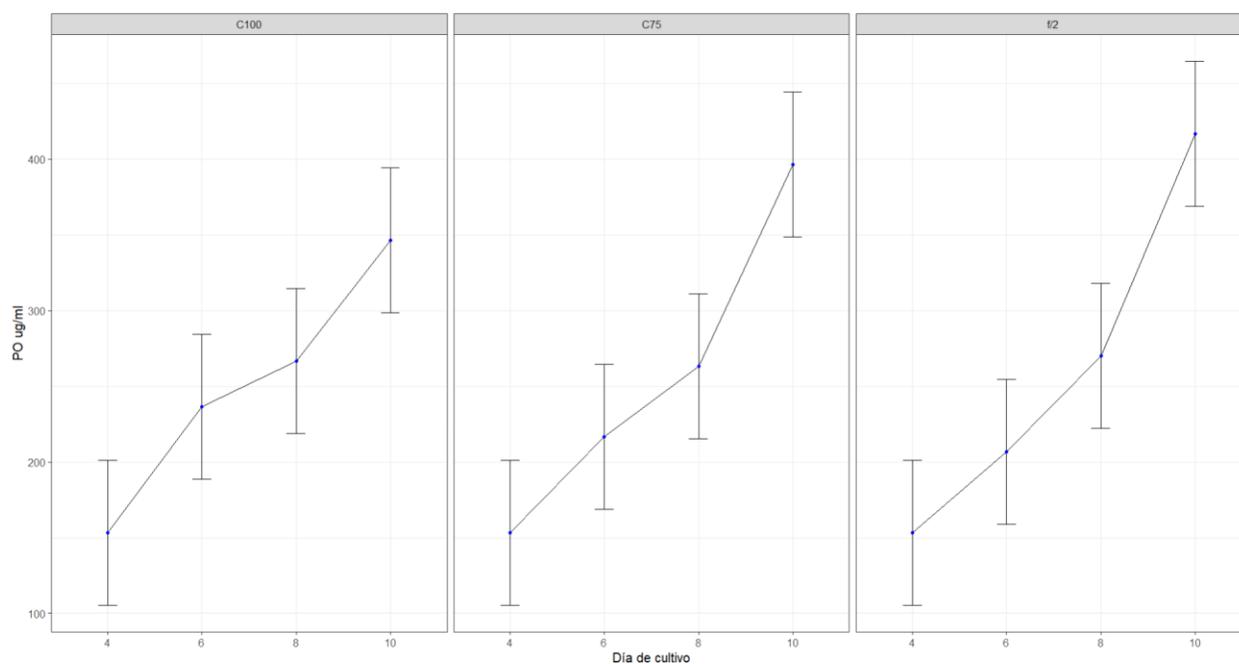
Anexos



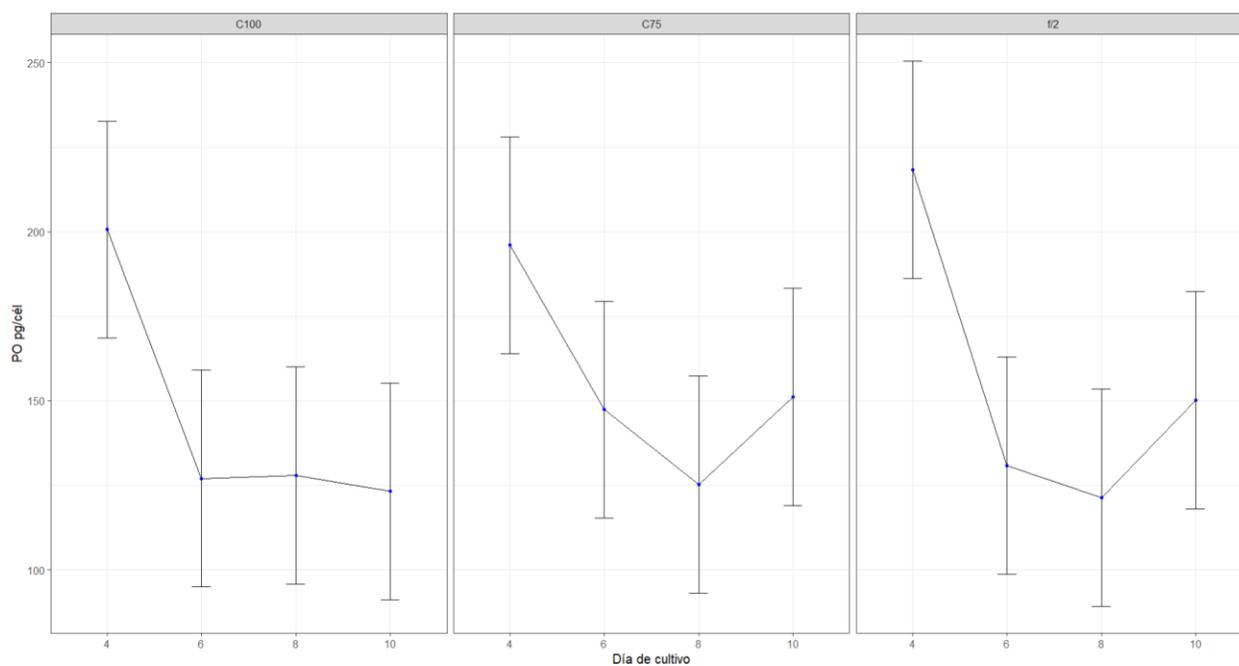
Anexo A. Figura 13. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95 % del peso total (PST) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de los tratamientos “f/2” (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo.



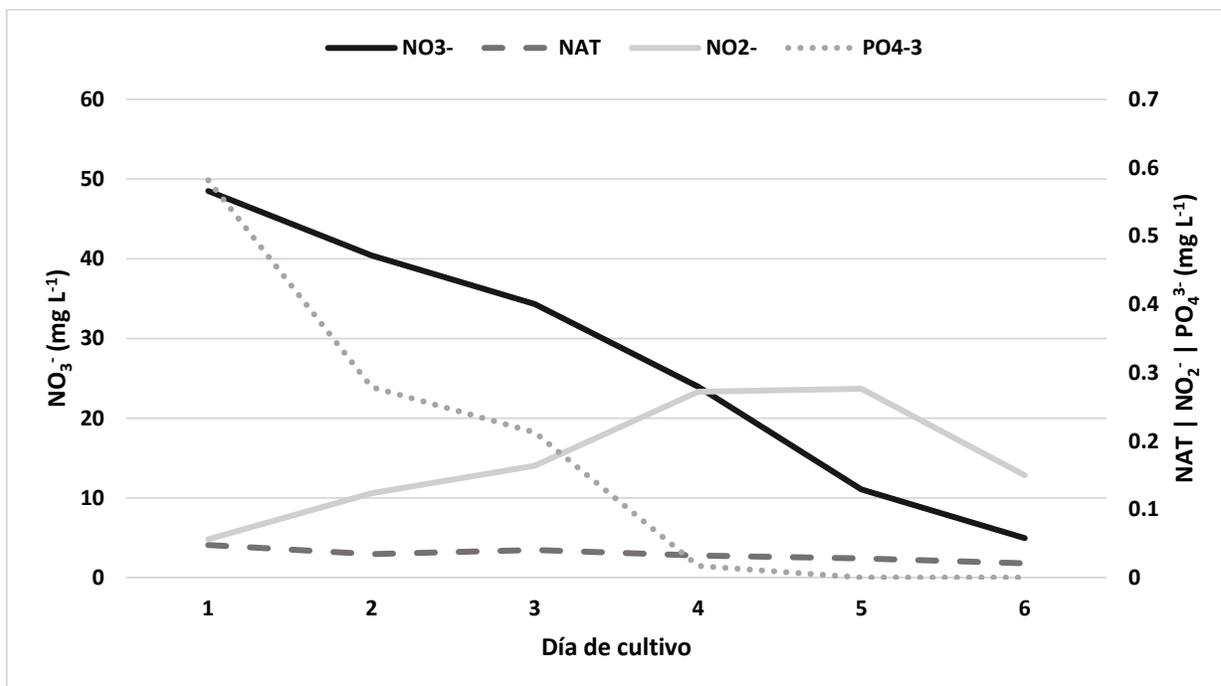
Anexo B. Figura 14. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso total (PST) en pg cél^{-1} de los tratamientos “f/2” (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo.



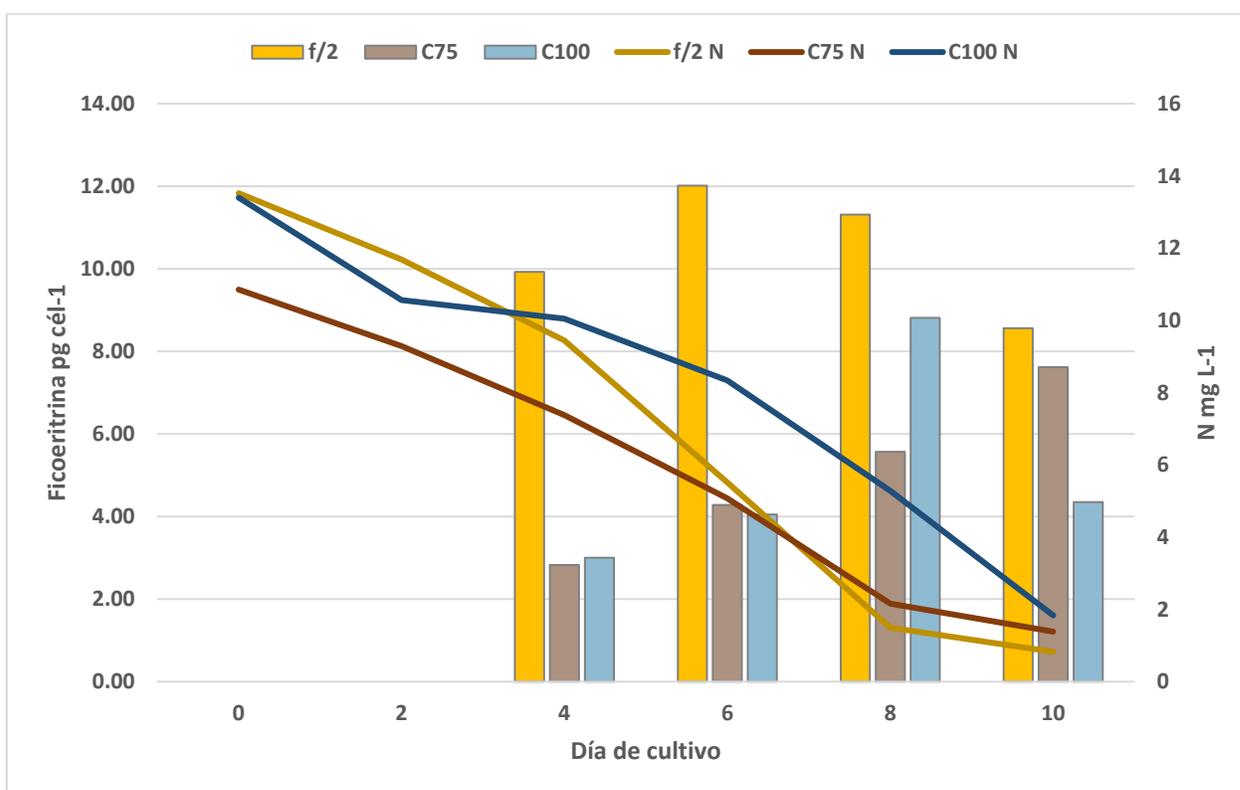
Anexo C. Figura 15. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso orgánico (PO) en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de los tratamientos “f/2” (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo.



Anexo D. Figura 16. Contraste de medias marginales estimadas con intervalos de confianza del 95% del peso orgánico (PO) en pg cél^{-1} de los tratamientos “f/2” (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo.



Anexo E. Figura 17. Comparación y dinámica simplificada del nitrógeno amoniacal total (NAT), nitratos (NO₃⁻), nitritos (NO₂⁻) y fosfatos (PO₄³⁻) en el cultivo de *Porphyridium cruentum*.



Anexo F. Figura 18. Comparación y comportamiento de la concentración estimada de nitrógeno residual (N) y la concentración de ficoeritrina de los tratamientos "f/2" (control), C75 (75% de agua de efluente de camarón) y C100 (100% de agua de efluente de camarón), en los diferentes días de cultivo

