



CULTIVO DE LA MICROALGA NANNOCHLOROPSIS LIMNETICA EN AGUA RESIDUAL DE INVERNADERO

Cultivation of microalgae *Nannochloropsis limnetica* in
greenhouse drain water

Francisco Javier Guiscafré Rodea¹, Juan Fernando García
Trejo¹, Marieke Vanthoor-Koopmans^{1*}

¹Universidad Autónoma de Querétaro,
Cerro de las campanas S/N, Santiago de Querétaro,
Querétaro, 76010, México

*Autor de correspondencia
franco_vam@hotmail.com

RESUMEN

La microalga *Nannochloropsis limnetica* es la única especie de su género que es de agua dulce y presenta la peculiaridad de contener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 del tipo eicosapentaenoico (EPA). Los ácidos grasos EPA han demostrado un gran impacto en enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, funcionamiento cerebral y salud mental lo que les da un alto valor económico. El objeto de la presente investigación fue evaluar la factibilidad de cultivar la microalga *N. limnetica* en aguas residuales provenientes de un invernadero hidropónico de producción de jitomate, con la finalidad de reducir costos de producción. Al terminar la investigación, se comprobó que esta microalga si puede ser cultivada en agua residual de invernadero, obteniéndose inclusive mejores resultados que un medio comercial (BG11) conocido por ser eficiente en el cultivo de microalgas de agua dulce. Además se pudo comprobar que la microalga puede crecer en el agua residual a lo largo de todo el año de la producción hortícola del invernadero.

Palabras clave

Microalgas, agua residual, invernadero, omega 3, ácido eicosapentaenoico, cultivo.

ABSTRACT

The microalgae *Nannochloropsis limnetica* is the only species of its genus that is freshwater and has the peculiarity of containing a high content of Eicosapentaenoic acid (EPA), which is a polyunsaturated fatty acid. EPA fatty acids have shown to have major impact on cardiovascular diseases, inflammatory diseases, brain function and mental health, which gives them a high economic value. The objective of the present investigation was to evaluate the feasibility of cultivating *N. limnetica* in wastewater from a hydroponic

greenhouse of tomato production, in order to reduce production costs. At the end of the research, it was verified that this microalgae can be cultivated in greenhouse wastewater, obtaining even better results than a commercial medium (BG11) known to be efficient in the cultivation of freshwater microalgae. In addition, it was verified that microalgae can grow in the wastewater throughout the year of the horticultural production of the greenhouse.

Keywords

Microalgae, wastewater, greenhouse, omega 3, eicosapentaenoic acid, culture.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares con una gran variedad de usos, como es el caso de biofertilizantes, biocombustibles, alimentación animal, alimentación humana, medicina, farmacéutica, nutraceútica y cosmética todas de gran importancia en la salud humana (Hernandez y Labbe, 2014). Otro uso de las microalgas es el tratamiento de aguas residuales de distintas fuentes como son industrial, doméstico y agrícola, ya que pueden crecer de manera adecuada en los altos niveles de nutrientes presentes en estas aguas (Park *et al.*, 2011a, Park *et al.*, 2011b, Abdel-Raouf *et al.*, 2012). De no ser tratadas, estas aguas pueden ocasionar graves problemas de eutrofización, que es una consecuencia de la elevada concentración de nutrientes, como es el caso de nitratos y fosfatos.

Debido a esto, es indispensable que se desarrollen nuevas tecnologías que permitan una mejor reutilización de los residuos, que sean de bajo costo y disminuyan el impacto ambiental ocasionado por este tipo de residuos. Entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas adquieren gran importancia, ya que, pueden remover de una manera muy eficiente y rápida contami-



nantes tanto de medios líquidos como gaseosos (Olguín, 2003, Dominic et al., 2009, Doušková et al., 2010, León y Chaves, 2010, González-López et al., 2011, Rawat et al., 2011), incorporándolos a su metabolismo generando biomasa de alto valor comercial (Markou y Georgakakis, 2011). La microalga *N. limnetica* es un microorganismo fotosintético, unicelular, que pertenece a un pequeño grupo de algas de la clase Eustigmatophyceae. Presenta una forma esférica u ovalada con un tamaño de 1.5-6 X 2.5- 6µm y es la única especie del genero *Nannochloropsis* de agua dulce. Descubierta en Alemania en 1998 presenta la peculiaridad como todo el género de contener ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 del tipo EPA. (Kriemitz, et al., 2000). Los ácidos grasos omega (en especial omega 3 y 6) han sido altamente reconocidos como beneficiosos en la salud humana. (Grimm et al., 1994; Ruxton et al., 2004; Tacon y Metian 2013). De manera particular el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) que han demostrado un gran impacto en enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, funcionamiento cerebral y salud mental, siendo incorporados en fórmulas lácteas debido a que ayudan al desarrollo adecuado de los infantes (Ruxton et al., 2004), de ahí su importancia en poder cultivarla a bajo costo y con un alto nivel de calidad. El género *Nannochloropsis* ya ha sido probado que crece de manera satisfactoria en aguas residuales como es el caso de Lins, et al. (2014) y Sirin y Sillanpa, (2015), pero la especie *N. limnetica* de manera particular ha sido poco estudiada. La finalidad de la presente investigación es comprobar la factibilidad del crecimiento de la microalga *N. Limnetica* en aguas residuales provenientes de la producción hortícola de invernadero.

2. METODOLOGÍA / MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aclimatación de la microalga.

N. limnetica CCMP2260 fue adquirida del laboratorio Bigelow en el estado de Main, USA. Para su aclimatación, *N. limnetica* se inoculó en botellas Simax de 1 L con un diámetro de 10 cm, en medio BG11 de laboratorios Sigma. Medio y botellas fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121°C. La aireación de las botellas se realizó con material de acuario, como son, bombas de aire, válvulas, mangueras de silicón y difusores, todo el material también fue esterilizado en autoclave. Las botellas fueron colocadas dentro del laboratorio a una temperatura promedio de 21°C. La iluminación administrada fue artificial con luz blanca a 53 lumen/W en un ciclo de luz/obscuridad de 12/12. El pH se controló usando CO₂ atmosférico (350ppm). La microalga se dejó aclimatar por un periodo de un mes.

2.2 Experimento agua residual de invernadero vs medio comercial BG11.

El experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones en las que se realizó la aclimatación de la microalga, es decir, se agregó el inóculo en botellas de un litro, controlando luz, aireación, pH, fotoperiodo y temperatura. Se prepararon dos medios: agua destilada estéril y medio BG11 al 2% como control y agua residual del invernadero. El experimento se realizó por duplicado, por lo que se pusieron 2 botellas con cada medio. Antes del experimento las botellas fueron esterilizadas en autoclave por 20 min a 121°C y como desinfección adicional se colocaron por 30 min en una cámara con luz UV. Las mediciones fueron tomadas una vez al día, a las 9:00am. El volumen de muestra tomado diariamente fue de 3mL y no se agregó más medio para no diluir la concentración en las botellas. Para cuantificar el crecimiento se utilizó un espectrofotómetro marca Lamote, midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, realizándose la medición por triplicado. De acuerdo a

la ley de Lambert y Beer, cuando el valor de la absorbancia estaba por encima de 0.8 se realizaron diluciones para llevarlo a un valor entre 0.3 y 0.8 y disminuir el error en la medición. El pH fue ajustado a 8.4 con NaOH y HCL solo inicialmente después de inoculada las botellas. Para verificar la concentración de nutrientes inicial y asegurar que esto no sería una limitante, se midió nitratos (NO_3) y fosfatos (PO_4). El primero con un medidor laquatwin de la marca Horiba modelo B-340 y el segundo con un medidor de la marca Hanna Instruments modelo HI 736. Todas las botellas fueron inoculadas a una densidad óptica inicial de 0.2. Se realizó observación diaria a microscopio, para asegurar que las botellas no estuvieran contaminadas con otros microorganismos que pudieran afectar el experimento.

2.3 Experimento nutrientes.

Para poder evaluar si la microalga *N. limnetica*, podía ser cultivada en el agua residual del invernadero de la producción de jitomate a lo largo de las variaciones de todo el año, se verificó con datos proporcionados por la empresa de la cual se obtuvo el agua residual, el comportamiento de los nutrientes (NO_3 y PO_4) en el agua del 2012 al 2016. La empresa analiza su agua residual quincenalmente mandando sus muestras al laboratorio Relab den Haan en los países bajos. Se obtuvo la concentración para NO_3 y PO_4 que aparecía con mayor frecuencia "moda", el valor máximo y el valor mínimo. Con base a los datos obtenidos se llevó a cabo el experimento. *N. limnetica* fue inoculada por duplicado en las tres concentraciones (máximo, mínimo y moda) y se evaluó el comportamiento. Para preparar las concentraciones se utilizó la misma fórmula que se utiliza en el invernadero, para mantener la misma proporción de nutrientes y se realizaron diluciones. De igual manera que el experimento anterior, el resultado se llevó a cabo bajo condiciones controladas y estériles, en botellas de un litro. Se realizó observación diaria a microscopio,

para asegurar que las botellas no estuvieran contaminadas con otros microorganismos que pudieran afectar el experimento.

2.4 Crecimiento de la microalga.

Para poder evaluar el aumento en el crecimiento promedio de las microalgas se calculó la tasa de crecimiento a partir de la pendiente de la regresión lineal en la fase del crecimiento exponencial.

$$k = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

Donde k (d^{-1}) es la tasa de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial, N_0 es la densidad óptica al inicio de la fase exponencial (t_0) y N representa la densidad óptica al tiempo (t) de la fase exponencial.

También se evaluó el tiempo de duplicación de las microalgas (T), es decir, el tiempo en días en que tarda una célula en duplicarse.

$$T = \ln 2 / k \quad (2)$$

3. Resultados y discusiones

N. limnetica CCMP2260 pudo ser cultivada en el agua proveniente del cultivo de jitomate de un invernadero hidropónico como puede observarse en la figura 1. Comparándose el desarrollo en el agua residual contra el medio BG11, se obtuvo mejor crecimiento en el agua residual, con una tasa de crecimiento de 0.14 y 0.11 d^{-1} respectivamente y un tiempo de duplicación para *N. limnetica* en agua residual de 4.95 y en medio BG11 de 6.3. Yubin, et al (2014), al igual que el presente experimento, evaluaron la tasa de crecimiento de 9 cepas de *Nannochloropsis*, entre ellos *N. limnetica*, inoculándola también en medio BG11, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.07 d^{-1} , lo que nos ayuda a corroborar la eficiencia del uso del agua residual del invernadero para cultivar la microalga *N. limnetica*. Esto se puede explicar por la cantidad de nutrientes disponibles en el



medio. Como todos los organismos, las microalgas tienen un mejor crecimiento cuando la concentración de nutrientes es óptima para ellas y varía dependiendo de la especie. Esto quiere decir que a una concentración de nutrientes alta o baja el crecimiento disminuye. Makareviciene (2011) cultivando *Chlorella* sp. en medio BG11, encontró, que a tres diferentes concentraciones de nitrato de 203, 544 y 1094.21 ppm, el crecimiento fue afectado, considerando los 10 primeros días de cultivo, obtuvo un mayor crecimiento en el menos concentrado, siguiéndole la segunda y tercera concentración. Esto indica en nuestro caso, que la concentración de nutrientes existentes en el medio de agua residual de invernadero del cultivo de jitomate es más adecuada para la microalga *N. limnetica*, que la que le proporciona el medio BG11.

Por otro lado es también importante considerar la proporción de los nutrientes en el medio. Para el caso de nitrógeno y fósforo, una proporción de 16:1 es la más adecuada (Oswald, 1998), aunque varía dependiendo de la especie y de las condiciones externas como luz o temperatura, ya que de estas dependerán los requerimientos de la microalga. Una proporción alta de nitrógeno, respecto a fósforo, sugiere una limitación de fósforo, y una proporción baja, sugiere una limitación de nitrógeno.

Por lo tanto, limitaciones o excesos, de estos dos nutrientes, pueden afectar el crecimiento de las microalgas (Borowitzka, 1998). Esto lo podemos corroborar con lo encontrado por Mayers, (2014). Observo que proporciones de N:P mayores a 32:1 afectan gravemente la productividad, ya que las células comien-

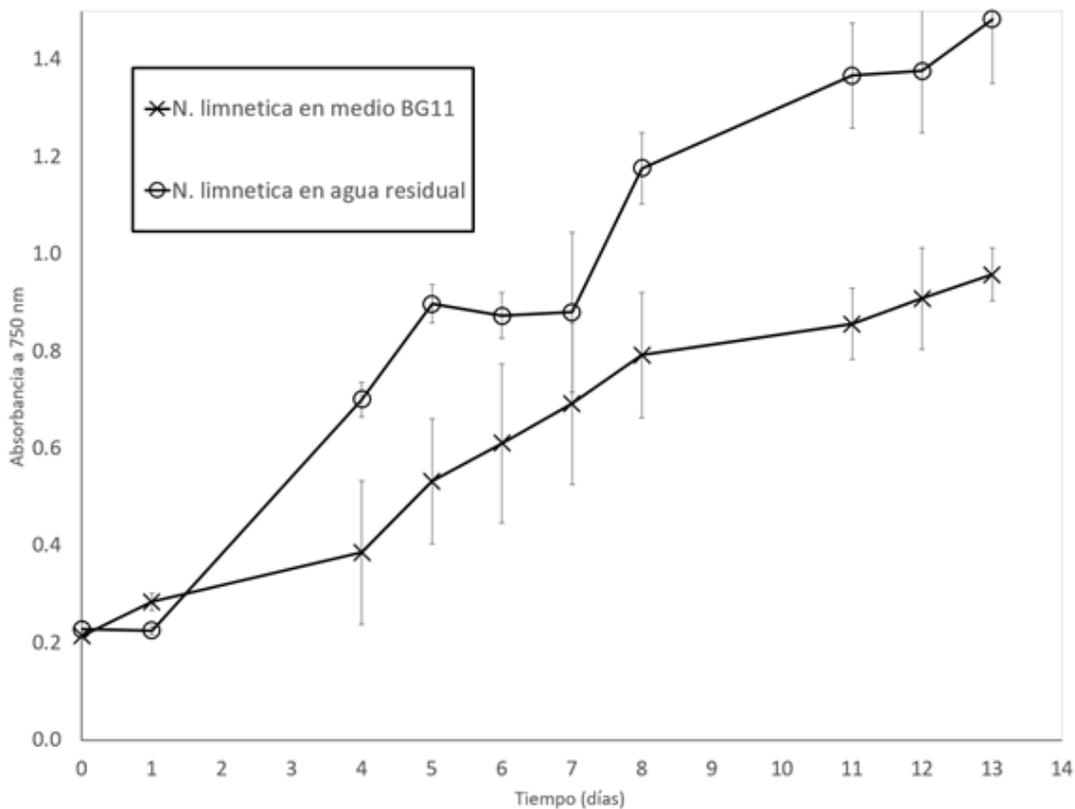


Figura 1. Promedios del crecimiento de la microalga *Nannochloropsis limnetica* cultivada en dos medios: Agua residual de invernadero de producción hortícola y en un medio comercial BG11.

zan a tener problemas para dividirse debido a la falta de Fosforo. En nuestro experimento la concentración de NO_3 y PO_4 y sus proporciones, se describen en la siguiente tabla:

La proporción tan alta entre nitrógeno respecto a fosforo, que hay en el medio BG11 como se indica en la tabla 1, sugiere que la limitación de fosforo puede ser la razón principal por la que se obtuvo un mejor crecimiento en el agua residual de invernadero. Aunque algunos autores lo utilizan para evaluar el crecimiento de microalgas de agua dulce (Makareviciene, 2011., Yubin et al., 2014), el medio BG11, debe ser usado más para mantener cultivos y no para crecer microalgas de manera óptima. De los datos analizados mencionados en la sección 2.3, se obtuvo la proporción de N:P en el agua residual a lo largo del año. La que aparece con más frecuencia es 5:1, lo que concuerda con

la proporción obtenida en este experimento, pero va desde 4:1 hasta 25:1. Sin embargo estas proporciones siguen dentro del rango requerido por las microalgas. Para el medio de agua residual de invernadero, una proporción de N:P de 5:1, parece ser adecuado para el crecimiento de *N. limnetica*, aunque se requiere una investigación posterior, para encontrar el óptimo de crecimiento.

Ya que se pudo constatar que la microalga *N. limnetica* puede crecer en agua residual de invernadero de producción de jitomate, el siguiente paso fue comprobar, que puede ser cultivado a las diferentes concentraciones de nutrientes que se dan a lo largo de todo el año, ya que varían considerablemente, como se puede constatar en la tabla 2, donde se observa la concentración mínima, máxima y la moda para NO_3 y PO_4 .

	NO3 (ppm)	PO4 (ppm)	Proporción N:P
BG11	1094	5.25	124:1
Agua residual de invernadero	830	120	5:1

Tabla 1. Concentración y proporción N:P, de NO_3 y PO_4 en el medio BG11 y en el agua residual de invernadero de cultivo de jitomate.

	Nitratos (ppm)	Fosfatos (ppm)
Máximo	2347.9	337
Moda	886	160
Mínimo	664.5	93

Tabla 2. Valores máximos, mínimos y moda, de nutrientes encontrados en las aguas residuales de producción hortícola de invernadero del 2012 al 2016.



Los tres medios preparados a partir del histórico del agua residual del invernadero del 2012 al 2016 se muestran en la tabla 3.

Como se puede observar en la figura 2, una vez más la microalga *N. limnetica* pudo ser cultivada en agua residual de invernadero de manera satisfactoria y crecer a las diferentes concentraciones de nutrientes existentes en el agua residual a lo largo de todo el año de producción de jitomate. Sin embargo se obtuvo un mejor crecimiento en la moda, siguiéndole la mínima y la máxima. Las tasas de crecimiento y tiempo de duplicación se observan en la tabla 4.

Si se compara la tasa de crecimiento obtenida en el experimento 1, con las de este ex-

perimento, en este fueron más altas. Esto se atribuye a la temperatura, ya que fue la única variable que no se pudo controlar completamente, ya que se tenía a temperatura del laboratorio.

Los datos encontrados arrojan información valiosa para ser utilizada en el escalamiento a una escala comercial, ya que como en cualquier producción, los nutrientes son uno de los costos más elevados, por lo que de poderse suprimir este gasto, se podrán reducir los costos operativos de manera importante. Además del beneficio adicional que brindan las microalgas, como es, el reducir el impacto ambiental, por el tratamiento que se le da al agua.

	Nitratos (ppm)	Fosfatos (ppm)
Máximo	2112.8	302.5
Moda	1052	238
Mínimo	618	121.55

Tabla 3. Medios preparados para evaluar si la microalga *N. limnetica* puede crecer en las variaciones de nutrientes existentes en el agua residual del invernadero del cultivo de jitomate.

	Tasa de crecimiento d⁻¹	Tiempo de duplicación
Máximo	.21	3.35
Moda	.24	2.94
Mínimo	.22	3.12

Tabla 4. Tasas de crecimiento y tiempo de duplicación para la microalga *Nannochloropsis limnetica*, a tres concentraciones diferentes en agua residual de invernadero de producción de jitomate.

4. CONCLUSIÓN

La microalga *N. limnetica* puede ser cultivada en el agua residual de invernadero de una producción hortícola de jitomate. Comparando el crecimiento con el medio BG11 usado actualmente de manera comercial para cultivar microalgas de agua dulce, presenta una mejor tasa de crecimiento y menor tiempo de duplicación en el agua residual del invernadero. A diferentes niveles de nutrientes como son los encontrados en el agua residual a lo largo del año de la producción de jitomate, una concentración en el agua residual de alrededor de 886 ppm de nitratos y 160 ppm de fosfatos produce la mayor tasa de crecimiento lo que favorece

el cultivo ya que es la que se presenta con mayor frecuencia a lo largo de todo el año. Sin embargo, la microalga *N. limnetica* puede crecer a niveles tan bajos como 618 ppm de nitratos y 121 ppm de fosfatos o tan altos como 2347 ppm de nitratos y 337 ppm de fosfatos.

Esta investigación ofrece la posibilidad de disminuir los costos de producción de microalgas en el mundo debido a que los nutrientes no generan un costo al ser obtenidos del residuo de otra operación, ofreciendo la posibilidad de obtener un nuevo producto de alto valor comercial y reduciendo el impacto negativo en el ambiente al reducir los altos niveles de nutrientes contaminantes.

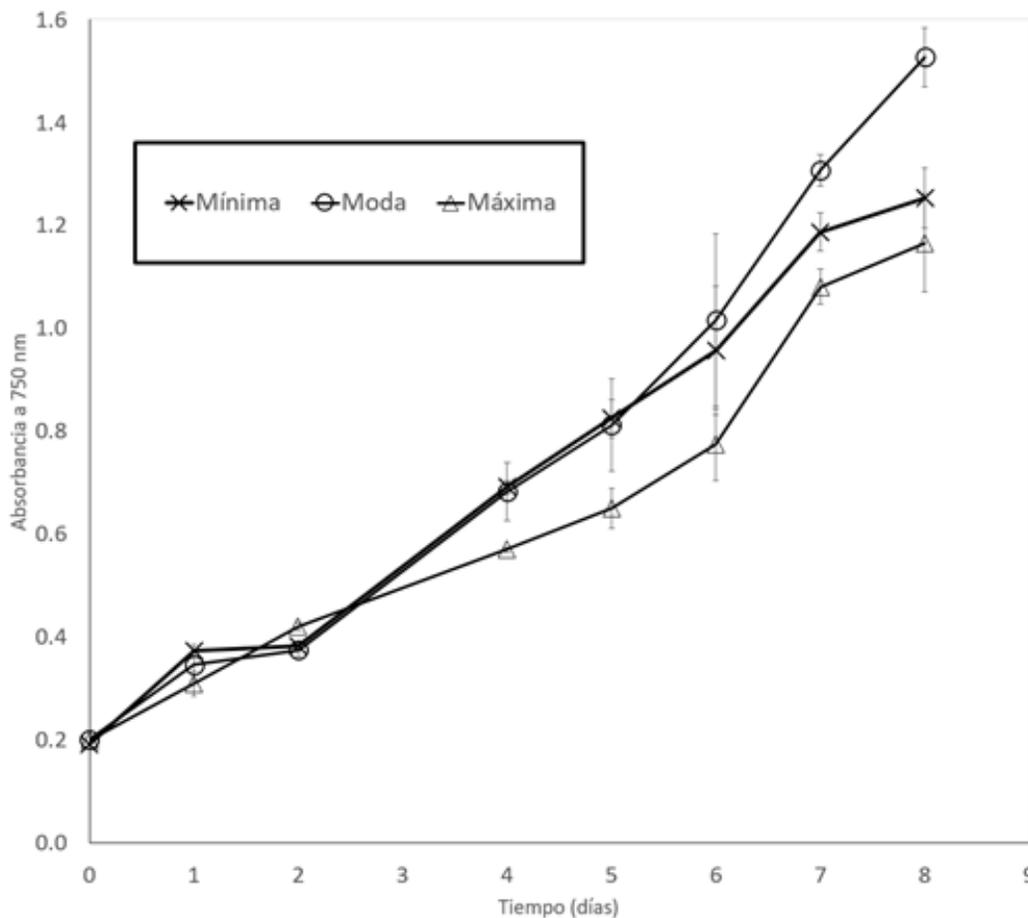


Figura 2. Crecimiento en el tiempo de la microalga *Nannochloropsis limnetica* en tres concentraciones diferentes de agua residual de invernadero de producción de jitomate.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro de manera especial al Dr. Juan Fernando García Trejo por su apoyo y dirección en la investigación. A la Dra. Marieke Koopmans por iniciarme en el mundo de las microalgas y a la empresa Finca Ahuehuetes por el apoyo financiero en la investigación.

REFERENCIAS

Abdel-Raouf, N., A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.

Borowitzka, M.A. 1998. Limits to growth, in *Wastewater treatment with algae*, Y.-S. Wong and N.F.Y. Tam, Editors. Springer Verlag. p. 203–226.

Dominic, V.J., S. Murali and M.C. Nisha. 2009. Phycoremediation efficiency of three algae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Gloeocapsa gelatinosa*. *Academic Review* 16(1- 2): 138-146.

Doušková, I., F. Kaštánek, Y. Maléterová, P. Kaštánek, J. Doucha and V. Zachleder. 2010. Utilization of stillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration- microalgae-products. *Energy Conversion and Management* 51: 606-611.

González-López, C.V., F.G. Acién, J.M. Fernández-Sevilla y E. Molina. 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogéni-

cas de CO₂. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 2(2): 93-106.

Grimm, H., A. Tibell, B. Norrlind, C. Blecher, S. Wilker, y K. Schwemmler. 1994. Immunoregulation by parental lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *JPEN-Parenter. Enter.*, 18, 417–421.

Hernandez-Perez, A., y J.I. Labbe. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49, 157-173.

Krienitz, L., H. Dominik, H.B. Stich, and W. Weiler. 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia*, Volume 39 (3), 219-227.

León, C., y D. Chaves. 2010. Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 1(2): 155-177.

Lins, L., D.H. Silveria, E. Andrade, and L.Wessels. 2014. Cultivation of *Nannochloropsis* sp. in brackish groundwater supplemented with municipal wastewater as a nutrient source. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 No.2.

Makarevičienė, V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., and J. Kasperovičienė. 2011. Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management* No. 3(57), P. 21 – 27.

Markou, G., and D. Georgakakis. 2011. Cultivation of filamentous cyano-

bacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389-3401.

Mayers, J., K.J. Flynn, and R.J. Shields. 2014. Influence of the N:P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 169, 588-595.

Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22: 81-91.

Oswald, W.J. 1988. Micro-algae and waste-water treatment, in *Micro-algal biotechnology*, M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka, Editors. Cambridge University press: Cambridge. p. 305-328.

Park, J., R. Craggs, and A. Shilton. 2011a. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 35-42.

Park, J., R. Craggs, and A. Shilton. 2011b. Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research* 45: 6637-6649.

Rawat, I., R. Ranjith-Kumar, T. Mutanda, and F. Bux. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88: 3411-3424.

Ruxton, C.H.S., S.C. Reed, M.J.A., Simpson, and K.J. Millington. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 17, 449-459.

Sirin, S., and M. Sillanpa. 2015. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. *Bioresource Technology*, 191, 79-87.

Tacon, A.G., and M. Metian. 2013. Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev. Fish. Sci.*, 21, 22-38.