



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y
USO INTEGRAL DEL AGUA**

**CULTIVO DE MICROALGAS (*Neochloris oleoabundans* y
Chlorella sp.) EN AGUA RESIDUAL Y EXTRACCIÓN DE
SUS ÁCIDOS GRASOS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA
Y USO INTEGRAL DEL AGUA**

PRESENTA:

YANELI MARTÍNEZ CRUZ



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JULIO 2013



**CULTIVO DE MICROALGAS (*Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.*) EN
AGUA RESIDUAL Y EXTRACCIÓN DE SUS ÁCIDOS GRASOS**

Tesis realizada por Yaneli Martínez Cruz bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

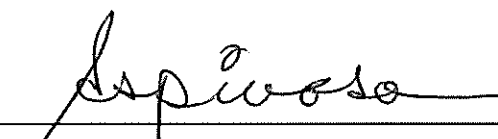
MAESTRA EN INGENIERÍA AGRÍCOLA
Y USO INTEGRAL DEL AGUA

DIRECTOR:



DRA. GUADALUPE HERNÁNDEZ EUGENIO

CO-DIRECTOR:



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR:



DR. FEDERICO FÉLIX HAHN SCHLAM

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres, a mi hijo,
mi hermano, mis hermanas y al amor de mi vida
por brindarme la paciencia, confianza y
apoyo durante mis estudios.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para el desarrollo de mis estudios de posgrado, gracias.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por abrirme sus puertas para adquirir y desarrollar mis habilidades académicas, además a todo el personal del posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, al departamento de Irrigación y Mecánica por el uso de sus instalaciones y laboratorios.

A Dios por estar conmigo y llenar mi vida de dicha, bendiciones y concederme la gracia de poder llegar a este día brindándome la fortaleza necesaria para terminar otra meta en mi camino.

A mis padres Faustina y Nazario por su paciencia, cariño, comprensión, consejos, enseñanzas y apoyo incondicional durante toda mi vida. Gracias por estar siempre conmigo para guiarme siempre al buen camino. Me siento feliz de tenerlos como padres.

A mi hijo César porque me has dado la dicha de ser madre y ser la luz e inspiración para seguir adelante; sin ti no sería lo mismo. Gracias por darme tu alegría y amor.

A mi hermano Eduardo y mis hermanas Delia Esmeralda y Karina gracias por su cariño, apoyo y por tener confianza en todo lo que puedo hacer.

Al amor de mi vida Alfredo Gracias por tu paciencia, confianza, amor y apoyo incondicional para poder realizar mis metas y seguir adelante por el bienestar de la familia.

A mi directora de Tesis: Dra. Guadalupe Hernández Eugenio gracias por su paciencia, sus excelentes consejos, por confiar en lo que podía hacer, por dirigirme y guiarme para que este trabajo se hiciera realidad.

A mis asesores: Dr. Teodoro Espinosa por todo el apoyo para realizar mi trabajo, paciencia en la revisión y los consejos para mejorarlo. **Dr. Federico Félix Hahn** por la paciencia que tuvo para revisar mi trabajo.

A la Dra. Diana Guerra y al Dr. Benito Reyes por el apoyo desinteresado en la realización de actividades experimentales.

A la M. en C. Érica Morales Hernández: Gracias por orientarme durante mis experimentos.

A la C. Aurorita por el apoyo en la revisión de tesis

A mis maestros de IAUIA: Gracias por todo el tiempo invertido en las aulas, por su paciencia, por sus consejos profesionales y también personales.

A mis amigos: Edder, Dr. Ángel, Nely, Edith, Mari Carmen y Ricardo Adolfo
por su ayuda en la realización de este trabajo en las mediciones y otras actividades en las que me brindaron su apoyo.

Gracias a todos los que me apoyaron en este trabajo y que estuvieron conmigo para que esto fuera posible, gracias a todos los que se menciona en este texto y a los que sin estarlo participaron de una u otra forma para finalizar este proyecto de vida.

DATOS BIOGRÁFICOS

Yaneli Martínez Cruz nace en Tlatlauquitepec, Puebla el 20 de diciembre de 1986, realizó sus estudios de primaria en la escuela “Gral. Ignacio Zaragoza” en el municipio de Zaragoza, Puebla. Cursó la secundaria en la Escuela Secundaria Federal “Netzahualcoyotl”, en Zaragoza, Puebla.

En el año 2001 ingresa a la Preparatoria Gral. Lázaro Cárdenas dependiente de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en la ciudad de Puebla, Puebla. En el año 2004 ingresa a la licenciatura de Biología en la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla egresando en el año 2009, posteriormente ingresa a laborar en el Instituto de Investigaciones Forestales, como asistente de investigación, bajo el mando del Dr. Enrique Alarcón, en Xalapa, Veracruz, durante junio 2009 a febrero 2010.

En el año 2011 se postula para ingresar al Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, es aceptada para ingresar en agosto del 2011 y se interesó por el área de Uso Integral del Agua, con el trabajo titulado “CULTIVO DE MICROALGAS (*Chlorella* sp. y *Neochloris oleoabundans*) EN AGUA RESIDUAL Y EXTRACCIÓN DE SUS ÁCIDOS GRASOS.

Índice

Lista de figuras.....	i
Lista de cuadros.....	iv
Resumen	v
Abstract.....	v
Capítulo 1	
1 Introducción	1
1.2 Objetivo	2
Capítulo 2	
2 Revisión de literatura	3
2.1 Generación de Aguas Residuales	3
2.2 Tratamiento de aguas residuales	4
2.3 Microalgas	5
2.3.1 Parámetros para el cultivo de microalgas	7
2.3.2 Asimilación del nitrógeno.....	10
2.3.3 Contenido lipídico de las microalgas	13
2.3.4 Síntesis de lípidos	17
2.3.5 Cultivo de microalgas	21
2.4 Microalgas cultivadas en agua residual	23
2.5 Selección de cepa microalgal.....	28
Capítulo 3	
3. Material y Métodos	31
3.1 Microalgas.....	31
3.2 Preservación de las microalgas.....	31
3.3 Origen y descripción del agua residual del efluente del digestor anaeróbico..	34

3.4 Diseño experimental.....	36
3.5 Técnicas analíticas.....	37
3.5.1 Nitrógeno amoniacal (N -NH ₃).	37
3.5.2 Nitrato (N- NO ₃)	38
3.5.3 Fosforo total.	38
3.5.4 pH	40
3.5.5 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	40
3.5.6 Determinación de Sólidos.....	42
3.6 Condiciones de cultivo	44
3.7 Remoción de nutrientes	44
3.8 Evaluación de biomasa algal.	46
3.8.1 Concentración celular	46
3.8.2 Sólidos totales y volátiles	47
3.9 Evaluación de lípidos totales	48
3.9.1 Procedimiento para evaluar la composición de ácidos grasos	50
3.10 Análisis estadístico.....	51

Capítulo 4

4. Resultados y discusión	52
4.1 Mantenimiento de las microalgas	52
4.2 Adaptación de las microalgas al efluente	55
4.3 Experimentación previa de remoción de nutrientes.....	56
4.4 Remoción de nutrientes en el efluente	59
4.4.1 Remoción de nitrógeno amoniacal	60

4.4.2 Remoción de nitrógeno nítrico.....	63
4.4.3 Remoción de fósforo	64
4.4.4 Demanda química de oxígeno.....	65
4.4.5 Crecimiento celular	66
4.4.6 Contenido de lípidos y ácidos grasos	69
4.5 Calculo de la tasa de remoción de nutrientes.	71

Capítulo 5

5 Conclusión	75
Referencias bibliográficas	77

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Vía de asimilación del nitrógeno inorgánico en algas eucariotas.	12
Figura 2. Biosíntesis de lípidos microalgales.	19
Figura 3. Morfología de <i>Neochloris oleoabundans</i>	29
Figura 4. Morfología de <i>Chlorella sp.</i>	30
Figura 5. Preservación de las microalgas en medio BBM.....	33
Figura 6. Reactor simple donde: 1 es la entrada para el aire, 2 Medio de cultivo con agitador y difusor de burbujeo y 3 salida del aire..	33
Figura 7. Reactor inoculado con las microalgas y puesto en marcha.....	33
Figura 8. Biodigestor de flujo continuo (parte superior) y fosa de efluentes (parte inferior).....	34
Figura 9. Cámara de Neubauer..	47
Figura 10. Densidad celular de <i>N. oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> cultivadas en BBM. Inicio de adaptación a1) conteo celular, b1) densidad óptica; segunda etapa a2) conteo celular; b2) densidad óptica; tercera etapa a3) conteo celular, b3) densidad óptica.	54
Figura 11. Crecimiento celular de <i>N. oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> cultivadas	

en agua residual del efluente de un digestor anaeróbico.

a) Concentración celular y b) densidad óptica.....56

Figura 12. Remoción de fósforo por *Neochloris oleoabundans* y

Chlorella sp. cultivadas en agua residual..57

Figura 13. Remoción de DQO por *Neochloris oleoabundans* y

Chlorella sp. cultivadas en agua residual.58

Figura 14. Densidad celular de *Neochloris oleoabundans* y

Chlorella sp. cultivadas en agua residual. a) Conteo celular y
b) peso seco con base en sólidos totales.....59

Figura 15. Eliminación de nitrógeno amoniacal del agua residual por

cultivos de: a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.*
en concentraciones de 90,50, 25 mg·l⁻¹ de N-NH₄⁺61

Figura 16. Eliminación de nitrato del agua residual por cultivos de

a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.* en
concentraciones 90,50, 25 mg·l⁻¹ de N-NH₄⁺63

Figura 17. Tendencia del pH durante el cultivo de

(a) *Neochloris oleoabundans* y
(b) *Chlorella sp.* cultivadas en 90, 50 y 25 mg·l⁻¹ de N-NH₄⁺63

Figura 18. Correlación entre nitrato y pH de *Neochloris oleoabundans*,

r= -0,72 y *Chlorella sp*, r = -0,91 durante 9 días
en diferentes concentraciones de N- NH₄⁺64

Figura 19 .Curvas de crecimiento a) <i>Neochloris oleoabundans</i> y b) <i>Chlorella sp.</i> en agua residual del efluente de un digestor con diferentes concentraciones de N- NH_4^+ ..	67
Figura 20. Evolución de los sólidos volátiles de a) <i>Neochloris oleoabundans</i> y b) <i>Chlorella sp.</i> en agua residual del efluente de un digestor con diferentes concentraciones de N- NH_4^+ ..	68
Figura 21. Cromatograma de ácidos grasos obtenidos de la muestra de lípidos totales..	70
Figura 22.Ajuste de la remoción de nitrógeno amoniacal al modelo en <i>N. oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> en concentraciones de a y d) $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ , b y e) $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ , c y f) $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ ..	73
Figura 22.Ajuste de la remoción de nitrato al modelo en <i>N. oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> en concentraciones de a y d) $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ , b y e) $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ , c y f) $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N- NH_4^+ ..	74

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1. Contenido lipídico de microalgas en condiciones autotróficas.	6
Cuadro 2. Requerimientos principales de cultivos de microalgas.....	7
Cuadro 3. Contenido de aceite de algunas especies de microalgas.....	15
Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en diferentes microalgas.....	18
Cuadro 5. Composición de Medio Bold Basal.....	32
Cuadro 6. Resultados de los análisis fisicoquímicos del efluente.....	35
Cuadro 7. Contenido de fósforo en el cultivo de las microalgas.	65
Cuadro 8. Remoción de DQO del efluente de un digestor anaeróbico por cultivos de <i>Neochloris oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> en varias concentraciones de NH_4^+	66
Cuadro 9. Porcentaje de lípidos de <i>N. oleoabundans</i> y <i>Chlorella sp.</i> cultivadas a tres concentraciones de nitrógeno amoniacal.	69
Cuadro 10. Resumen del contenido de lípidos y perfil FAME de las microalgas cultivadas en el efluente.....	71
Cuadro 11. Cálculo de la tasa de eliminación de nitrógeno amoniacal.....	72
Cuadro 12. Cálculo de la tasa de eliminación de nitrato.	72

Cultivo de microalgas (*Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.*) en agua residual y extracción de sus ácidos grasos.

Cultivation of microalgae (*Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.*) in wastewater for biomass production and lipid extraction.

Yaneli **Martínez Cruz**¹ y Guadalupe **Hernández Eugenio**²

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la remoción de nutrientes de agua residual del efluente de un digestor anaeróbico mediante el cultivo de microalgas (*Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.*) y producción de biomasa algal y ácidos grasos. *Neochloris oleoabundans* removió el 93.6 % de NH_4^+ y *Chlorella sp.* 73 % en concentración de $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. La eliminación de NO_3^- fue del 58.8 % y 72.6 % en *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* respectivamente en la concentración de $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. El fósforo fue eliminado al 100 % por ambas microalgas al tercer y séptimo día. El crecimiento celular fue de $1.06 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ en *Neochloris oleoabundans* y $1.36 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ en *Chlorella sp.* El porcentaje de lípidos totales acumulados en *N. oleoabundans* fue del 19 % en concentración de $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$ y *Chlorella sp.* acumuló 28.3 % cultivada bajo concentración de $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. Los ácidos grasos identificados fueron principalmente palmítico, linoleico, araquidónico, oleico y esteárico. Se concluye que *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* pueden remover los nutrientes del efluente de un digestor anaeróbico, producir biomasa y acumular lípidos.

Palabras claves: efluente, remoción de nutrientes, microalgas.

1 Tesista

2 Director

Abstract

This study was conducted to evaluate nutrient removal of wastewater from an anaerobic digester effluent through the cultivation of microalgae (*Neochloris oleoabundans* and *Chlorella sp.*) and production of algal biomass and fatty acids. *Neochloris oleoabundans* removed 93.6 % of NH_4^+ and *Chlorella sp.* 73 % at the concentration of $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. Nitrate removal was 58.8 % and 72.6 % in *Neochloris oleoabundans* and *Chlorella sp.* respectively, at the concentration of $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. Phosphorus removal was 100% by both microalgae on the third and seventh day. Cell growth was $1.06 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $1.36 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ in *Neochloris oleoabundans* and *Chlorella sp.*, respectively. Total accumulated lipid in *N. oleoabundans* was 19 % at the concentration of $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$, and *Chlorella sp.* accumulated 28.3 % when grown with $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NH}_4^+$. Fatty acids identified were mainly palmitic, linoleic, arachidonic, oleic and stearic acids. We conclude that *Neochloris oleoabundans* and *Chlorella sp.* can remove nutrients from the effluent of an anaerobic digester, biomass produce and lipids accumulate.

Keywords: effluent, nutrients removal, microalgae.

CAPÍTULO

1

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el problema de la contaminación del agua ha tomado relevancia en diferentes ámbitos de la comunidad científica y tecnológica, porque es indispensable para el desarrollo de la sociedad. El tratamiento del agua residual debe realizarse de manera económica y viable. Uno de los sistemas de tratamiento de agua residual es la digestión anaeróbica. Ésta se ha convertido en una tecnología atractiva para el tratamiento de aguas residuales dado su bajo costo comparada con los sistemas de tratamiento biológicos aeróbicos y los tratamientos fisicoquímicos.

La digestión anaeróbica es un proceso por el cual los desechos orgánicos de residuos municipales, agrícolas, pueden ser biológicamente mineralizados en ausencia de oxígeno. Las diversas poblaciones microbianas degradan los residuos orgánicos para generar biogás y otros compuestos como productos finales. La digestión anaeróbica se utiliza para reducir la demanda química de oxígeno, disminuir la putrefacción y malos olores; sin embargo, los efluentes generados a partir de este proceso aumentan la disponibilidad de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo que aún contienen. Los efluentes al

descargarse a los cuerpos de agua provocan eutrofización afectando al ecosistema.

Una alternativa para mitigar este problema es emplear los efluentes para el cultivo de microalgas. Las microalgas tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno y el fósforo inorgánico para generar biomasa. La biomasa se utiliza para producir biocombustible, metano, fertilizantes, productos químicos y alimento para animales.

El cultivo de microalgas ofrece una solución al tratamiento terciario de aguas residuales para la producción de biomasa y ácidos grasos, reduciendo costos en comparación con los sistemas de tratamiento, así como la mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero, por lo que lleva a una importante sinergia económica para el proceso.

Existen una gran variedad de microalgas que pueden cultivarse en agua residual, principalmente del género *Chlorella* que son adaptables a esta agua y pueden acumular lípidos; sin embargo, existen otras especies oleaginosas que pueden producir gran cantidad de lípidos hasta en un 80% en medios de cultivo específico como la especie *Neochloris oleoabundans*.

1.2 OBJETIVO

Evaluar la remoción de nutrientes de agua residual del efluente de un digestor anaeróbico mediante el cultivo de microalgas (*Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.*) y determinar la producción de biomasa algal y ácidos grasos.

CAPÍTULO

2

2 ANTECEDENTES

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generación de Aguas Residuales

Las aguas residuales se definen como aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, agrícolas, así como la mezcla de ellas (Rodríguez y Durán, 2006). Sus principales contaminantes son nutrientes (nitrógeno y fósforo), organismos patógenos (bacterias y virus), materia orgánica, detergentes, metales pesados y sustancias químicas (Silk y Ciruna, 2004).

En México, las aguas residuales que se generan, crean un caudal total de 255 m³/s, de los cuales se captan 205 m³/s, y de está sólo se trata el 36.4%. En aguas residuales municipales se generan 2.02 millones de toneladas de DBO₅ y sólo se remueven 0.61 millones de toneladas. El agua residual de uso no municipal incluye la industrial y genera 6.95 millones de toneladas de DBO₅, de las cuales sólo se remueve 1.33 millones de toneladas (CNA, 2011). En 2011, el volumen de aguas residuales provenientes de los centros urbanos fue de 236.3 m³/s (SEMARNAT, 2011). Los contaminantes no eliminados son directamente descargados a cuerpos de aguas superficiales o suelos agrícolas;

al mismo tiempo que generan materia orgánica con contenido de nutrientes como nitrato, amonio, fósforo, entre otros. Se estima que el agua residual domestica contiene 76 mg.l^{-1} de N-NO_3 (Crittenden *et al.*, 2005), $50\text{-}70 \text{ mg.l}^{-1}$ de N, $15\text{-}20 \text{ mg.l}^{-1}$ de P, $300\text{-}600 \text{ mg.l}^{-1}$ DQO y $200\text{-}300 \text{ mg.l}^{-1}$ DBO_5 (Crites y Tchobanoglous, 2000). Sin embargo la composición del agua residual puede variar como lo menciona Cortés (1993) con $20\text{-}60 \text{ mg.l}^{-1}$ de N, $12\text{-}50 \text{ mg.l}^{-1}$ de amoniaco, fósforo total de $6\text{-}20 \text{ mg.l}^{-1}$, DBO_5 $100\text{-}350 \text{ mg.l}^{-1}$ y $250\text{-}1000 \text{ mg.l}^{-1}$ de DQO.

2.2 Tratamiento de aguas residuales

Los cuerpos de agua son incapaces de depurar grandes cantidades de desechos municipales e industriales (MEA, 2005; UNEP, 2007). Algunos de los contaminantes que se encuentran en el agua residual son elevados contenidos de carbono determinados como demanda biológica de oxígeno (DBO_5) y demanda química de oxígeno (DQO), nutrientes como nitrato, fosfato, amonio, además de metales pesados y microorganismos patógenos (Esponda 2001). En consecuencia, una de las acciones más importantes para evitar su deterioro es el tratamiento de las aguas residuales. Dicho tratamiento es importante para evitar impactos negativos en los cuerpos de agua, ya que éstos contaminantes generan problemas de eutrofización.

Cabe señalar que algunos efluentes de aguas residuales de excretas de ganado tienen alto contenido de nutrientes. Este tipo de efluentes después de ser sometidos a tratamiento secundario aún contienen elevadas concentraciones de nutrientes; como efluentes de digestión anaeróbica de

estiércol lechero que contienen 125-3456 mg·l⁻¹ de nitrógeno total y 18-250 mg·l⁻¹ de fósforo total (Wang *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011), efluentes de gallinaza con 1380-1580 mg·l⁻¹ de nitrógeno total y 370-382 mg·l⁻¹ de fósforo total (Yetilmezsoy *et al.*, 2008; Yetilmezsoy *et al.*, 2009), efluentes de depuradoras de lodos con 427-467 mg·l⁻¹ de nitrógeno total y 134-321 mg·l⁻¹ de fósforo total (Montusiewicz *et al.*, 2010), así como efluentes de residuos de alimentos y estiércol lácteos con 1,640 mg·l⁻¹ - 1,885 mg·l⁻¹ de nitrógeno total Kjeldahl y 296-302 mg·l⁻¹ de fósforo total (El y Zhang, 2007). Por lo tanto, el contenido de nutrientes en efluentes provenientes de granjas puede ser sometido a un tratamiento terciario con algas.

2.3 Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias, llamadas algas verde-azuladas) y eucariontes (tradicionalmente algas verdes), que se localizan en diversos hábitats como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Garibay *et al.*, 2009).

Son responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 de las cuales se desconoce su composición bioquímica y metabolismo (Garibay *et al.*, 2009).

Las microalgas se clasifican de acuerdo a diferentes parámetros como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular, sin embargo, las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas son las algas verdes y diatomeas. Dentro la división Chlorophyta se encuentran especies que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo, pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones. Algunas especies como *Botryococcus braunii* llega acumular hasta un 85% de contenido lipídico, mientras que *Neochloris oleoabundans* un 88.8% (cuadro 1).

La división Bacillariophyta, comúnmente llamada diatomea agrupa a especies que predominan en aguas oceánicas, no obstante también se encuentran en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares, almacenar carbono como aceite. Algunas de ellas como la especie *Nitzschia laevis* llega a tener el 69.1% de lípidos mientras *Cyclotella sp.* contiene el 54 %, cuadro 1 (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan et al., 1998; Hu et al., 2008).

Cuadro 1. Contenido lipídico de microalgas en condiciones autotróficas.

Chlorophyta	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso -seco x100)	Diatomeas	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso -seco x100)
<i>Botryococcus brauniivar. A</i> ^{2,5}	43.0 – 63.0	<i>Cyclotella cryptica</i> ²	36.8
<i>Botryococcusbrauniivar. B</i> ^{2,5}	53.0 – 86.0	<i>Cyclotella sp.</i> ²	54.0
<i>Chlorella emersonii</i> ^{9,10}	63.0	<i>Nitzschia laevis</i> ¹⁰	69.1
<i>Chlorella minutissima</i> ^{9,10}	57.0	<i>Nitzschia pelea</i> <i>Kutz</i> ^{2,8}	27.2 – 39.5

<i>Chlorella protothecoides</i> ¹⁰	23.0	<i>Nitzschia sp.</i> ^{1,4}	22.1 – 47.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{2,8}	14.4 – 35.8	<i>Phaeodactylum</i> <i>ornutum</i> ²	31.0
<i>Chlorella sorokiana</i> ^{9,10}	22.0	<i>Skeletonema</i> <i>costatum</i> ²	30.3
<i>Chlorella sp.</i> ¹	28.0 – 32.0		
<i>Neochloris oleoabundans</i> ^{2,3}	18.9 – 88.8		
<i>Nannochloropsis salina</i> ⁸	40.8 – 72.2		
<i>Dunaliella salina</i> ^{2,4,8}	9.2 – 47.2		
<i>Dunaliella primolecta</i> ^{1,2,8}	23.0 – 53.8		
<i>Scenedesmus obliquus</i> ⁹	11.0 - 55.0		
<i>Scenedesmus dimorphus</i> ^{2,8,9}	6.0 – 40.0		

¹Chisti, 2007; ²Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; ³Gatenby *et al.*, 2003; ⁴Ben-Amotz *et al.*, 1985; ⁵Metzger y Largeau, 2005; ⁸Cohen, 1986; ⁹Gouveia y Oliveira, 2009; ¹⁰Li y Liu, 2008.

2.3.1 Parámetros para el cultivo de microalgas

Cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a condiciones óptimas de crecimiento, así como producción de biomasa algal. Tanto la composición de las microalgas como su productividad están determinadas, principalmente por el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de nutrientes, intensidad y tipo de luz, la densidad celular del cultivo y la contaminación o depredación por otros organismos (Barsanti *et al.*, 2006). Los nutrientes necesarios para el crecimiento de las algas se presentan en el cuadro 2. Las concentraciones y nutrientes pueden variar de acuerdo al medio (Brennan y Owende, 2010).

Cuadro 2. Requerimientos principales de cultivos de microalgas

Requerimientos	Compuestos químicos	Valores
C	CO ₂ , CO ₃	g/ 100ml
O, H	O ₂ , H ₂ O	g/ 100ml
N	N ₂ , NH ₄ , NO ₃	g/100ml

P	PO ₄	g/100ml
S	SO ₄	g/100ml
Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100ml
Fe, Zn, Mn, B, Br, SI	Sales	mg/100ml
Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, A.	Elementos traza	ug /100ml
vitaminas	B ₁₂ , Tiamina y Biotina	ug/100ml

Algunos factores que pueden afectar el crecimiento son temperatura, intensidad de luz, pH y aireación.

Temperatura. La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27 °C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20 °C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16 °C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35 °C son letales para cierto número de especies. Sin embargo, existen gran variedad de microalgas capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas tal como *Chlorella* que puede crecer entre 5 y 42 °C, un rango fuera del cual se ven inhibidas o incluso mueren.

En sistemas abiertos de cultivo un incremento de temperatura se ve compensado con evaporación del agua, regulándose de este modo la temperatura máxima. En sistemas cerrados de cultivo es necesario la refrigeración adicional mientras que en zonas cálidas, la relación entre nivel de luz y temperatura puede afectar a la biomasa en gran medida.

Luz. Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en las algas. La intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados.

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) supone un 40% de la radiación total del sol. El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida siempre que ésta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo (fotolimitación). A partir de éste, los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados y la fotosíntesis se ve inhibida. A este fenómeno se le denomina fotoinhibición. En la mayoría de las microalgas la fotosíntesis se ve saturada a niveles lumínicos superiores al 30% de la radiación total que la Tierra recibe del Sol ($1,700\text{--}2,000\ \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$). Las algas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila de sus células; las algas adaptadas a bajas intensidades lumínicas tienen más clorofila (Stephens *et al.*, 2010). Sin embargo, Hu *et al.*, (1996 y 1998), demostraron que la productividad en función de la densidad del cultivo en g·l a diferentes intensidades lumínicas fue de 25 g·l en $2,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de $15\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en $870\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $5\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en $360\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cabe mencionar que la iluminación artificial puede contribuir a una producción continua.

pH. El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener el control del pH es necesario airear o adicionar CO_2 . El proceso fotosintético de fijación de CO_2

provoca un aumento gradual de pH en el medio, debido a la acumulación de OH^- , lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por volatilización a la atmósfera y eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos.

Aireación. La aireación o agitación es necesaria para facilitar la eficiencia en el transporte y homogenización de los nutrientes y pH, además de impedir la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del recipiente donde sea cultivada y mejora el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. Sin embargo, no todas las especies toleran una agitación fuerte que provee el reactor o recipiente para un mezclado, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

2.3.2 Asimilación del nitrógeno

En general, las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito y nitrógeno molecular. La fuente principal de nitrógeno en las microalgas es el nitrato. La asimilación del nitrato implica tres pasos: a) la absorción del nitrato dependiente de la enzima permeasa y requiere energía metabólica, b) la reducción de nitrato a amonio es independiente del ATP, requiere de ocho electrones, y es catalizada por la acción de dos enzimas (nitrato reductasa y nitrito reductasa), y c) la incorporación de amonio a esqueletos de carbono, tales como el grupo α -amino L-glutamato, que es catalizada por la glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), Figura 1. La vía GS-GOGAT también es responsable de la asimilación de amonio derivado de carbonos intracelulares y compuestos de nitrógeno durante la

fotorespiración y otros procesos. A pesar de que el nitrógeno es el componente principal de la atmósfera y es un elemento esencial para los organismos vivos, sólo algunos organismos altamente especializados pueden convertir el N_2 en forma asimilable. Este proceso es esencialmente anaeróbico, catalizada por la nitrogenasa, y restringidos a unos pocos microorganismos que pueden hacerlo en vida libre o en simbiosis con las plantas (Richmond, 1986).

Entre microalgas, sólo algunos tipos de cianobacterias (*Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Mastigocladus*, *Tolypothrix*, *Goleocapsa*) puede fijar el N_2 , a través de un proceso acoplado producido fotosintéticamente por el potencial redox y ATP utilizando células diferenciadas para proteger la nitrogenasa del oxígeno (Avron y Ben, 1992). Otras formas filamentosas noheterocystous tales como *Oscillatoria* y *Phormidium* pueden fijar el nitrógeno únicamente en ausencia de oxígeno y presencia de nitrógeno y monóxido de carbono. En general, el proceso de fijación de N_2 depende de la disponibilidad de amonio o nitrato. Una fotoproducción efectiva de amonio, nitrato, nitrito, o nitrógeno atmosférico se ha logrado químicamente mediante el bloqueo de la vía de la asimilación de amonio con L-metionina-DL-sulfoximina (MSX), una enzima específica irreversible inhibidora de la actividad glutamina sintetasa.

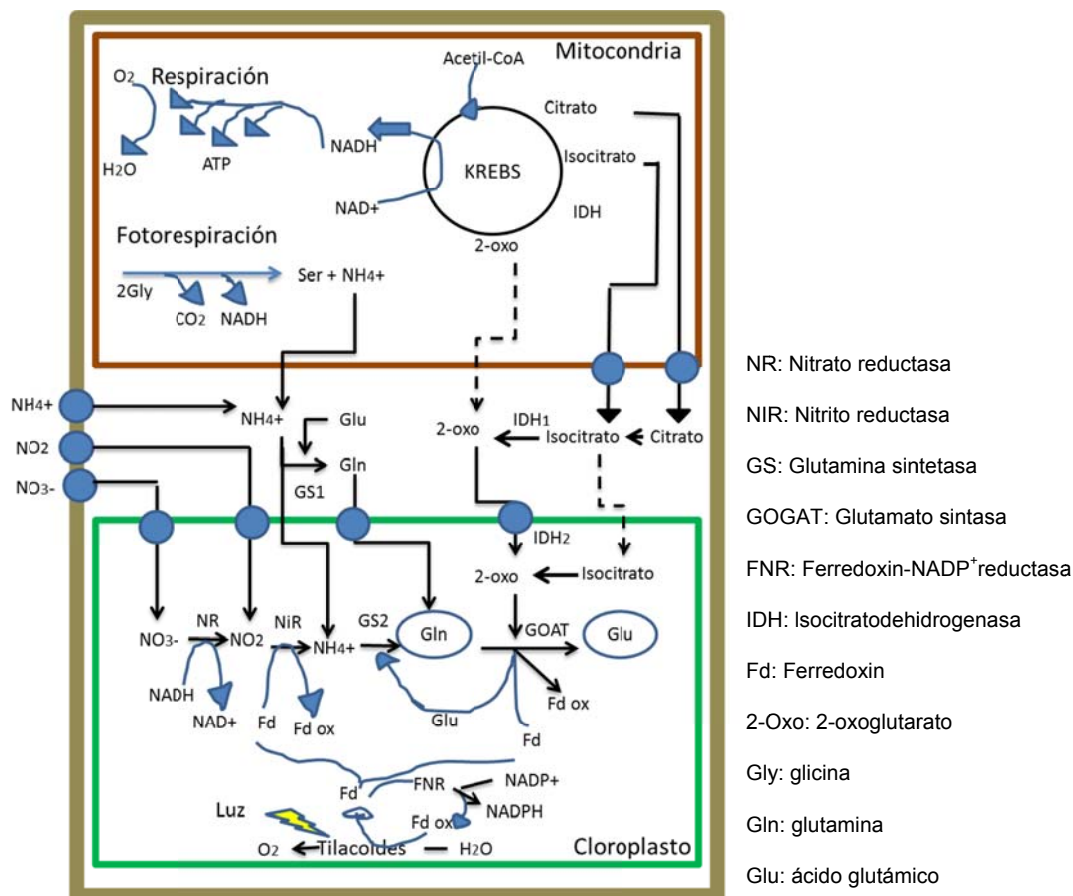


Figura 1. Vía de asimilación del nitrógeno inorgánico en algas eucariotas. Los círculos indican la presencia de permeasas para los metabolitos correspondientes (Vílchez *et al.*, 1997).

El amonio total en solución acuosa está compuesto por dos formas principales, el ion amonio (NH_4^+) y el amonio no ionizado (NH_3), los cuales son dependientes de pH y temperatura. La forma no ionizada es más tóxica debido a que no tiene carga y es soluble en lípidos, por lo tanto atraviesa las membranas biológicas con mayor facilidad que ion hidratado NH_4^+ (Wuhrmann y Woker, 1948; Downing y Merkens, 1955). El amonio desacopla el transporte electrónico en el fotosistema II (uno de los dos sistemas complejos que captan la energía lumínica y transportan los electrones por resonancia dentro de las células) y compite con el agua en las reacciones de oxidación que generan el O_2 libre. La tolerancia a él depende de la especie en cuestión (Ramos *et al.*,

1987). Por ejemplo *Spirulina* se inhibe ante concentraciones de $200 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$, mientras que *Chlorella sorokiniana* no muestra inhibición ante concentraciones de $400 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ (Rosenberg *et al.*, 2008).

2.3.3 Contenido lipídico de las microalgas

Las microalgas con producción lipídica son importantes para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008).

La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica. Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco en especies como *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Nitzschia sp.*, *Dunalella salina* entre otras, aunque se han reportado valores del 1 al 80% en *Neochloris oleoabundans*, *Botryococcus brauni*, *Schizochytrium sp.*, *Nannochloropsis salina* entre otras (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008; Takagi *et al.*, 2000; Li y Qin, 2005).

Las especies que producen más de un 30% de grasas se denominan 'oleaginosas' (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991). Los grupos taxonómicos a

los cuales pertenecen las microalgas oleaginosas son diversos. En los ejemplares eucariontes, el contenido lipídico es considerado como propio de la especie y no del género, de manera tal que este parámetro varía notablemente entre las especies individuales de cada grupo taxonómico (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2008). No obstante, de acuerdo con Hu *et al.*, 2008, es posible generalizar que microalgas oleaginosas eucariontes de grupos diversos (clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptofitas, eustigmatofitas, dinofitas, xantofitas y rodofitas) presentan, bajo condiciones normales de cultivo, una fracción lipídica promedio del 25.1%, magnitud que es superior (45%) en situaciones de estrés.

Recientemente, Rodolfi *et al.*, 2009, investigaron 30 especies para seleccionar aquellas con alta productividad en biomasa y alto contenido de lípidos, encontrando que *Nannochloropsis sp.*, una especie marina, es particularmente promisoría para la producción de aceite. De igual manera, Gouveia y Oliveira (2009), estudiaron 6 especies de microalgas tanto marinas como dulceacuícolas para elegir en términos de cantidad y calidad de aceite la mejor materia prima para la producción de biocombustibles; *Neochloris oleoabundans* (dulceacuícola) y *Nannochloropsis sp.* (marina) fueron las que mostraron mayor contenido de lípidos, 56 y 28.7%, respectivamente, como se muestra en el cuadro 3. El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007).

Cuadro 3. Contenido de aceite de algunas especies de microalgas.

Especie	Contenido de aceite (% del peso seco)	Productividad lípidos (mg·l⁻¹ d⁻¹)	Referencia
<i>Parietochoris incisa</i> ^(d)	60 ^a	Nr	Solovchenko <i>et al.</i> , (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp. ^(m)	60 ^a	204	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> ^(d)	56 ^a	13.22	Gouveia <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> ^(d)	42 ^a	12.77	Widjaja <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ^(m)	41.14 ^a	82	Mendoza <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i> ^(d)	43 ^b	Nr	Mandal y Mallick (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> ^(d)	38 ^c	133	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp. ^(m)	28.7 ^c	90	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> ^(d)	27 ^c	127.2	Francisco <i>et al.</i> (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i> ^(m)	30.7 ^c	151	Chiu <i>et al.</i> (2009)
<i>Dunaliella</i> ^(m)	67 ^c	33.5	Takagi <i>et al.</i> (2006)
<i>Choricystis minor</i> ^(d)	21.3 ^c	82	Mazzuca-Sobczuk y Chisti (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> ^(d)	50.3 ^d	Nr	Xiong <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> ^(d)	21 ^d	54	Wang <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i> ^(m)	73 ^e	Nr	Matsunaga <i>et al.</i> (2009)

^aCultivo bajo supresión de nitrógeno; ^bCultivo bajo deficiencia de nitrógeno; ^cCultivo con suficiencia de nutrientes; ^d cultivo heterotrófico; ^e Ausencia de nutrientes, m = marina y d = dulceacuícola; Nr = no reportado.

Los principales estímulos químicos para producción de lípidos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los físicos son la temperatura y la intensidad luminosa. La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (De *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009;

Rodolfi *et al.*, 2009). Por ejemplo el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* puede aumentar de 20% a un máximo de 40% en atmósfera de limitación de nitrógeno (Illman *et al.*, 2000).

Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan el contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008). Con respecto a la fase de crecimiento, Bigogno *et al.*, (2002) reportaron que en *Parietochloris incisa* se observó un alto contenido de triacilglicerol (43% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77% en la fase estacionaria. Asimismo, *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 80% de sus lípidos totales en forma de triglicéridos y la mayoría de sus ácidos grasos son saturados en el rango de 16 a 20 carbonos, bajo condiciones de estrés lo cual la coloca como una de las especies con mayor potencial para la producción de biodiesel (Tornabene *et al.*, 1983).

Sin embargo, los altos contenidos de lípidos producidos bajo limitación de nutrientes se asocian generalmente a la baja productividad de biomasa. En contraste, una fuente de nitrógeno es necesaria para mantener el crecimiento de las células con una mejor densidad celular (Feng *et al.*, 2011).

Una estrategia de cultivo para mejorar la productividad de lípidos (Widjaja *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2011) se da en dos etapas: en la primera etapa, las algas están con nutrientes suficientes para obtener una máxima densidad celular, lo más

rápidamente posible y en la segunda etapa se cambian las condiciones para activar la acumulación de lípidos.

2.3.4 Síntesis de lípidos

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1a 6) es variable, dominando por lo general la configuración cis. Los ácidos grasos de C16 a C18 son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (C10, C11, C14) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por ejemplo la división de la Cyanophyta, la especie *Trichodesmium erythraeum* contiene 27-50 % del total de ácidos grasos de C10, y del 2-5% de C11 (Parker *et al.*, 1967), por otra parte las especies de la división Bacillariophyta como *Biddulphia aurica* contiene el 32% de C14 (Orcuot y Patterson, 1975) y *Chaetoceros sp.* tiene 23.6% (Renaud *et al.*, 2002). Además de las Eustigmatophyta como *Nannochloropsis sp.* (Sukenik, 1999) y *Monodus subterraneus* (Cohen, 1999) tienen 6.9 y 2.3% de C14 respectivamente. De las Haptophyta, *Emiliania huxleyi* (Volkman *et al.*, 1981) contiene el 35.1% de C14, de las Cyanophyta *Aphanocapsa sp.* (Kenyon, 1972) contiene 29-34% de C14 y 9-13% de C14:2. En contraste con las microalgas que contiene C>20, se encuentran de la división pinguiphyceae la especie *Glossomastix chrysoplata* (Kawachi *et al.*, 2002) con el 13.3% de C22:5 ω 3 y de las dinophyta, las especies *Gymnodinium sanguineum* y *Scrippsiella sp.* (Mansour *et al.*, 1999) que contienen 24.2% y 18.8% de C22:6 ω 3, como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en diferentes microalgas

Especie	Ácido graso	%total de ácido graso	Nombre	
			IUPAC	Común
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	C10	27-50	Ácido decanoico	Ácido cáprico
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	C11	2_5	Ácido undecanoico	Ácido undecílico
<i>Aphanocapsa sp.</i>	C14	29-34	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico
<i>Emiliania huxleyi</i>	C14	35.1	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico
<i>Spirulina platensis</i>	C14	18	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico
<i>Emiliania huxleyi</i>	C15	2.2	Ácido pentadecanoico	Ácido pentadecílico
<i>Glossomastrix chrysoplata</i>	C16	24.8	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico
<i>Chlorella vulgaris</i>	C16	18.1	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico
<i>Chaetoceros sp.</i>	C16:1 ω 7	36.5		Ácido palmitoleico
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	C18	2_6	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico
<i>Parietochloris incise</i>	C18	2.1	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico
<i>Emiliania huxleyi</i>	C18:1 ω 9	14.3		Ácido oleico
<i>Chlorella vulgaris</i>	C18:1 ω 9	9.2		Ácido oleico
<i>Parietochloris incise</i>	C20:4 ω 6	58.9		Ácido araquídónico
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	C22:6 ω 3	24.2		Ácido docosahexaenoico
<i>Scrippsiella sp.</i>	C22:6 ω 3	18.8		Ácido docosahexaenoico
<i>Isochrysis galbana</i>	C22:6 ω 3	11.0		Ácido docosahexaenoico

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis de novo de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta

reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas.

Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 ω 9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación. Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). En la figura 2 se muestra un esquema que describe en términos generales la biosíntesis de lípidos microalgales.

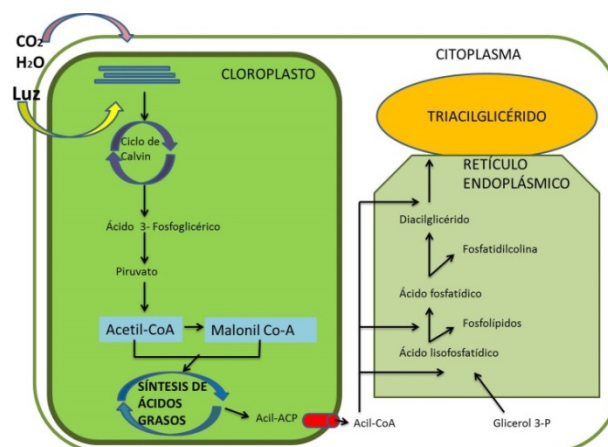


Figura 2. Biosíntesis de lípidos microalgales.

En términos generales, en el sistema fotosintético a partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua con la consecuente formación de protones, electrones y O₂, los cuales a su vez posibilitan la obtención de los productos fotosintéticos: ATP y NADPH. Estos productos fotosintéticos son el sustrato del Ciclo de Calvin el cual el CO₂ es fijado en moléculas de 3 átomos de carbono (3C), las cuales a su vez se asimilan como carbohidratos, lípidos y proteínas. El caso particular de los lípidos microalgales, las moléculas de 3C son transformadas a piruvato y acetil- CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil Co-A son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para la síntesis de novo de ácidos grasos (grupos acilo: ACIL-ACP). El mecanismo de transporte de ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1,2 y 3 de glicerol-3-fosfato donde algunos intermediarios son desviados hacia la síntesis de lípidos de membrana (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2009).

Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente). En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilglicerolos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas

endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas), aunque compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquenonas de cadena larga, entre otros, también ocurren (Cohen, 1986; Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Metzger y Largeau, 2005; Guschina y Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008).

No todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiesel, sin embargo, los apropiados para ello (ácidos grasos, libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados) son producidos con frecuencia y constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, usualmente del 20% al 40% (Cohen, 1986; Chisti, 2007). Un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad (Knothe, 2005).

2.3.5 Cultivo de microalgas

Un cultivo puede ser definido como un ambiente artificial en el que las algas crecen. En teoría las condiciones del cultivo deben semejarse al ambiente natural del alga. La imposición de un ambiente artificial en una población celular que sobrevivió anteriormente bajo condiciones complejas y fluctuantes, siguiendo un ciclo de vida estacional, causa un periodo de adaptación fisiológica o de selección, en el que el crecimiento de la población puede no ocurrir o es muy lento.

Para el cultivo de microalgas se han desarrollado varios medios de cultivo. Los medios de cultivo se utilizan para el aislamiento y cultivo de microalgas tanto de

agua dulce como marina, sin embargo tienen altos costos de producción (Robert, 2005). Algunos de ellos son modificaciones de medios de cultivo anteriores para cumplir un propósito en particular, algunos son derivados del análisis del agua donde se extrajo la microalga, otros se formulan después de un estudio detallado sobre un nutriente exclusivo del organismo, y algunas se han establecido después de considerar los parámetros ecológicos (Robert, 2005).

Tradicionalmente, las microalgas se cultivan comercialmente utilizando fertilizantes sintéticos, cuyo precio está vinculado a los altos precios del petróleo. Una alternativa es utilizar fertilizantes inorgánicos, residuos provenientes de abonos agrícolas en su estado natural, abonos derivados de estiércol de cerdos, aves de corral o efluentes de digestión anaeróbica de desechos lácticos, agua de drenaje, todas ellas con diferentes y variables contenidos de nutrientes para cultivar microalgas (Fenton Owen y ÓhUallacháin Daire, 2012). Sin embargo, si estas aguas residuales se utilizan como un medio de cultivo, los microorganismos compiten por el crecimiento y nutrición con las microalgas, por lo cual es necesario utilizar luz ultravioleta, filtración, centrifugación y esterilización como métodos de pre-tratamiento para eliminar sólidos suspendidos y microorganismos como protozoos y bacterias (Sriram y Seenivasan, 2012). Cabe mencionar que desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo, en la actualidad el interés ha girado hacia el tratamiento de aguas residuales, obtención de sustancias químicas, producción de fármacos y procesos de bioconversión energética (Huntley y Redalje, 2007).

2.4 Microalgas cultivadas en agua residual

El uso de agua residual para el cultivo de algas ofrece algunas ventajas como son el tratamiento terciario de agua residual, el cual es rentable, de bajo consumo de energía, reducción en la formación de lodos, reducción de gases de efecto invernadero y producción de biomasa algal que es una fuente de utilidad para obtención de lípidos y producir biodiesel u otros productos fotosintéticos como clorofila (Oilgae, 2009).

La mayor parte de las investigaciones sobre el tratamiento de aguas residuales con microalgas, se ha desarrollado en pequeña escala basada en cultivos de laboratorio, escala de lagunas piloto y de estanques experimentales. Las aguas residuales utilizadas para el crecimiento de las microalgas han sido principalmente agua residual municipal y agua residual generada de estiércol agrícola, y se ha centrado en la evaluación del potencial de las microalgas para la eliminación de nitrógeno y fósforo (Pittman *et al.* 2011).

Las aguas residuales pueden contener diferentes formas de nitrógeno (nitrato, amonio, urea), lo que es importante para conocer el efecto de los compuestos nitrogenados en diferentes microalgas en el crecimiento y eliminación de nutrientes. Algunos proyectos de investigación (Hyenstrand *et al.*, 2000; Vilchez *et al.*, 1997) han reportado que el amonio es más absorbido que el nitrato debido a la falta de la enzima nitrato reductasa en las células de microalgas. Xin (2010) demostró que la microalga *Scenedesmus sp.* LX1 crece rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato.

Algunas especies de microalgas verdes unicelulares como las del género *Chlorella* y *Scenedesmus* son tolerantes y crecen en condiciones en las que se encuentra el agua residual (Bhatnagar *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 1995; Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010), pueden eliminar más del 80% de amoníaco, nitrato y fósforo total en aguas residuales tratadas en fase secundaria (Martínez *et al.*, 2000; Ruiz-Marín *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008), lo que indica el potencial que tiene las microalgas para el tratamiento de aguas residuales terciarias.

Además existe interés en el uso de microalgas para la remediación de las aguas residuales industriales principalmente para la eliminación de metales pesados (cadmio, cromo y zinc) y toxinas químicas orgánicas (hidrocarburos, biocidas y tensioactivos), en lugar de N y P (Bashan y de- Bashan, 2010; Mallick, 2002). Debido a las bajas concentraciones de N y P, y altas concentraciones de toxinas, las tasas de crecimiento de las algas son menores en muchas aguas residuales industriales. Sin embargo, Chinnasamy *et al.*, 2010 realizaron un estudio en la generación de biomasa a partir de un efluente de un fábrica de alfombras y agua residual municipal en la ciudad de Dalton, GA, EE.UU., lograron cultivar dos microalgas de agua dulce *B. braunii* y *Chlorella saccharophila*, y un alga marina *Pleurochrysis carterae*.

Otros estudios han examinado el crecimiento de microalgas y la eliminación de nutrientes en aguas residuales sintéticas (Aslan y Kapdan, 2006; Lee y Lee, 2001; Abou-Shanab *et al.*, 2013). La utilización de un medio artificial proporciona la facilidad de su uso en laboratorio para experimentos iniciales,

además permite un análisis simplificado de los principales componentes de un medio de aguas residuales. Los medios de aguas residuales artificiales contienen componentes inorgánicos incluyendo concentraciones altas de nutrientes específicos y carece de material orgánico sólido y otras toxinas potenciales.

Al compararse las aguas residuales sintéticas con las aguas residuales municipales se encuentran que las tasas de eliminación de nutrientes y el crecimiento de microalgas son similares. Sin embargo, el crecimiento de las microalgas son más altas en aguas residuales sintéticas (Lau *et al.*, 1995; Ruiz-Marín *et al.*, 2010), debido al aumento de la toxicidad de la verdadera agua residual, efectos inhibitorios o competencia de bacterias y protozoos, y por la diferente composición química de las aguas residuales.

Otras investigaciones como la de Ruiz-Marín *et al.*, (2010) compararon el crecimiento de *Senedesmus obliquus* en cultivos semicontinuos y discontinuos, encontraron que el crecimiento inicial de más de cuatro ciclos de cultivo (cada 35 h se le añadía aguas residuales) fue mayor en cultivos semicontinuos, debido a un eventual agotamiento de los nutrientes, sin embargo, después de cuatro ciclos, el crecimiento y el contenido de clorofila de las células disminuyeron significativamente, lo que indica un colapso en el cultivo.

Algunos estudios han demostrado que las microalgas para crecer y eliminar eficazmente los nutrientes de las aguas residuales, el agua debe tener un proceso de decantación. La decantación es un método mecánico de separación de mezclas heterogéneas, las cuales están formadas por un líquido y un sólido,

o por dos líquidos. Es necesario dejar reposar la mezcla para que el sólido se sedimente, es decir, descienda y sea posible su extracción por acción de la gravedad. Lau *et al.* (1995) encontraron que *Chlorella vulgaris* eliminó más del 90% de N y el 80% de contenido de P de aguas residuales tratadas, además compararon el efecto de la variación de la densidad de inóculo. Utilizaron un inóculo concentrado de $1 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ y uno de baja densidad de $5 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ y encontraron que las tasas de crecimiento fueron diferentes entre todos los tratamientos y la eliminación de los nutrientes fueron iguales. El crecimiento algal en las aguas residuales fue eficaz y la eliminación de nutrientes depende de la densidad celular inicial.

Otros análisis han evaluado el crecimiento de *Chlorella sp.* en aguas residuales sin tratar y tratadas, durante tres periodos, lo que se obtuvo fue la eliminación de N, P, además la tasa de crecimiento fue equivalente en las aguas residuales antes y después de la decantación. El crecimiento de la microalga fue más alto en el tratamiento del agua residual concentrada generada por la centrifugación de lodos. La concentración de N y P en estas aguas residuales fue de $131,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de N total y $201,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de P total, por lo que las células aún fueron capaces de crecer perfectamente (Wang *et al.*, 2010).

Bhatnagar *et al.* (2010) evaluaron a *Chlorella minutissima* identificada en una laguna de oxidación para el tratamiento de aguas residuales en la India, el cual encontraron que esta especie fue capaz de crecer heterotróficamente en la oscuridad y mixotróficamente a la luz, en un amplio rango de pH y en presencia de sal. Además utilizaron amoníaco o nitrato como fuente de N. El crecimiento

de esta microalga demostró ser mejor en condiciones mixotróficas, con una productividad de biomasa de $379 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ después de 10 días de crecimiento comparado con la biomasa de $73.03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en condiciones autotróficas.

Todos estos experimentos demuestran que las microalgas clorófitas como *Chlorella* pueden crecer en aguas residuales crudas, agua residual sintética, en residuos de ácido cítrico, en medios heterotróficos con glucosa y efluentes de desechos lácticos.

En comparación con las aguas residuales municipales, industriales y artificiales; las aguas residuales agrícolas, que a menudo se deriva de estiércol porcino y bovino, pueden contener altos niveles de N y P (Wilkie y Mulbry, 2002). A pesar de estas altas concentraciones de nutrientes, los estudios han demostrado un crecimiento eficiente de las microalgas en los residuos agrícolas principalmente proveniente de estiércol bovino (An *et al.*, 2003; González *et al.*, 1997; Wilkie y Mulbry, 2002). An *et al.* (2003) evaluaron a *Botryococcus braunii* la cual creció bien en agua residual de excrementos porcinos que contenía $788 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{NO}_3$ y eliminó el 80% del contenido inicial de NO_3 . Existen casos realizados con una de las algas más oleaginosas que existen, *Neochloris oleoabundans*. Por ejemplo Levine *et al.*, 2011 realizaron una comparación del crecimiento de *Neochloris oleoabundans* cultivada en medio sintético y en el efluente de un digestor anaeróbico que trata desechos lácticos (El efluente se encontraba diluido a 1:50, 1:100 y 1:200), en el cual observaron que en ambos medios *N. oleoabundans* asimiló de 90 a 95% del nitrato y amonio inicial respectivamente. Wang y Lan (2011) evaluaron a *N. oleoabundans* en agua

residual sintética y agua residual del efluente de tratamiento secundario de agua residual, en el cual observaron que en agua sintética el crecimiento de las células de *N. oleoabundans* aumentó de $1.6\text{--}3.0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ cuando la concentración de nitrato de sodio aumentó de 45 a $140\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NO_3 . Sin embargo, el crecimiento celular se redujo cuando la concentración de nitrato de sodio aumentó de 140 a $218\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO_3 , lo que indica que $140\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO_3 es la concentración óptima para el crecimiento de esta microalga, la velocidad de eliminación de NaNO_3 alcanzó un máximo de $43,7\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\text{ día}^{-1}$ en $140\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO_3 . En agua residual el crecimiento fue de $0,68\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en 96 h, sin embargo, cuando el agua residual se enriqueció con $70\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NO_3 se obtuvo una densidad de $2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, por otra parte observaron que el incremento de nitrato a $105\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ no permite el crecimiento, probablemente porque limita el fósforo. Popovich *et al.* (2012) evaluaron la acumulación de biomasa y lípidos en cultivos de *N. oleoabundans* en agua de mar, en el cual obtuvieron una concentración de biomasa de $1.48\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $1.27\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en agua de mar y medio deficiente de N, respectivamente.

2.5 Selección de cepa microalgal

Neochloris oleoabundans y *Chlorella* sp. son especies con crecimiento rápido y contienen productos de valor agregado (lípidos, proteínas, carbohidratos o pigmentos), se desarrollan en ambientes extremos, las células son grandes en colonias o filamentos. Son tolerantes en condiciones ambientales como tolerancia a niveles altos de CO_2 (15% o más), a contaminantes y al efecto físico de la agitación o turbulencia (Griffiths y Harrison, 2009).

Para este estudio se utilizó la microalga *Neochloris oleoabundans* que es una microalga edáfica que presenta un alto contenido de lípidos (18-80 %) con respecto a su peso seco (Chisti, 2007), se ha demostrado que es de vital importancia por la aportación de lípidos neutros en especial triglicéridos (figura 3). Debido a su alto contenido de lípidos, se ha considerado un organismo para producir biocombustible, pigmentaciones y alimento para animal. *Neochloris* fue aislado de una duna de arena en Arabia Saudita por S. Chantanachat entre 1958-1962 (Band, 1991).

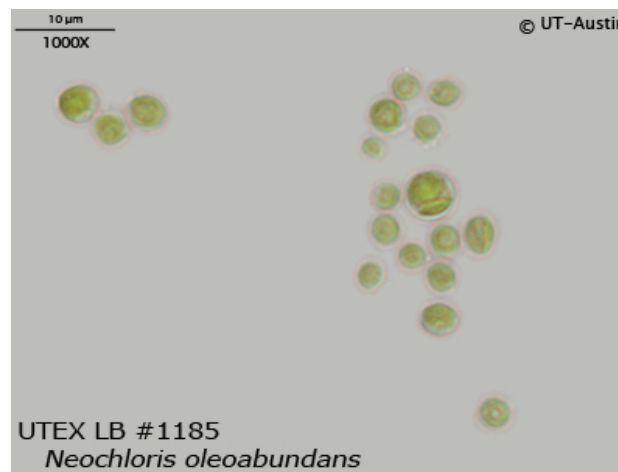


Figura 3. Morfología de *Neochloris oleoabundans*.

Su clasificación es Reino: Plantae, División: Chlorophyta, Clase: Chlorophyceae, Orden: Sphaeropleales, Familia: Neochloridaceae, Género: *Neochloris*, Especie: *Neochloris oleoabundans*

Chlorella apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años. Es un alga verde unicelular de agua dulce; de forma esférica, mide 2-10 micras de diámetro (figura 4). Se encuentra en lagos y pantanos por todo el mundo. El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde y del latín *ella*, que significa cosa pequeña, y fue descubierta y nombrada por el

holandés M.W. Beyerinck en 1890. Su clasificación taxonómica es (Lewin, 1962):

Reino: Protocista, División: Chlorophyta, Clase: Chlorophyceae, Orden: Chlorellales, Familia: Chlorellaceae, Género: Chlorella

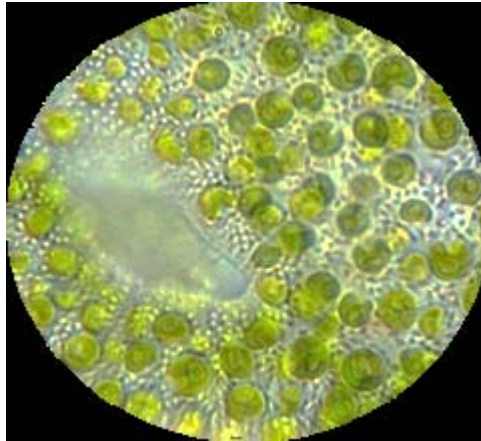


Figura 4. Morfología de *Chlorella sp.*

Chlorella contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila, 28-32 % de lípidos (Chisti, 2007) y un gran número de vitaminas y carotenos (Lee, 1995).

CAPÍTULO

3

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microalgas

Para este estudio se utilizaron dos especies de microalgas: *Neochloris oleoabundans* fue proporcionada por el Instituto de Biotecnología perteneciente a la UNAM, proveniente de la colección UTEX No. 1185; y *Chlorella sp.* fue donada por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.

3.2 Preservación de las microalgas

La conservación de las microalgas fue en el Medio Bold Basal (BBM, Richmond, 1986). El medio se preparó con diez soluciones estándar a la concentración que se indica en el cuadro 2. Las soluciones madre 1 al 6 del cuadro 5, se les adicionó 1 ml de H₂SO₄ concentrado por litro, y fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su utilización. Para preparar 1L de medio, a 500 ml de agua destilada se le adicionó 10 ml de cada una de las disoluciones madre y 1 ml de los elementos traza y se aforó a un litro, se ajustó el pH a 6.6 y se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos en autoclave.

Cuadro 5. Composición de Medio Bold Basal

Solución estandar	Concentración (g·l⁻¹)	g·l⁻¹
1.-NaNO ₃	25	10
2.-MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5	10
3.-K ₂ PO ₄	7.5	10
4.-KH ₂ PO ₄	17.5	10
5.-CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.5	10
6.- NaCl	2.5	10
7.-EDTA	50	1
8.- KOH	31	1
9.- H ₃ BO ₃	11.42	1
10.- Solución traza:		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.19	
CoCl ₂ ·6H ₂ O*	0.40	

* Elemento traza no incorporado al medio BBM preparado.

El mantenimiento de las dos microalgas fue en medio líquido BBM, en matraces de capacidad de 300 ml inoculados, utilizando 150 ml de BBM inoculado al 10 % v/v de microalgas, con una concentración inicial de aproximadamente 3×10^5 cel·ml⁻¹. Los matraces fueron cubiertos con tapones de gasa y algodón, los cuales permitieron la difusión del aire. Se mantuvieron a 25 °C y 120 rpm de agitación mecánica con una incubadora orbital (Thermo Scientific, modelo Max 4450). La iluminación fue con dos lámparas de luz blanca (8 watts), una de cada lado, a una intensidad de 4590 lux sin fotoperiodo, medido con un luxómetro (Stereon, Her410), como se muestra en la figura 5. Los cultivos fueron mantenidos bajo las condiciones mencionadas durante periodos de dos semanas que posteriormente fueron resembrados.



Figura 5. Preservación de las microalgas en medio BBM.

La resiembra de las microalgas fue escalado a litro con BBM en un fotobiorreactor simple. En la figura 6 y 7 se muestra el fotobiorreactor, que está constituido por un matraz Kitasato con 400 ml de agua estéril conectado a una bomba generadora de aire y a un frasco Koch de capacidad de 2 litros. El frasco Koch contenía el medio BBM estéril y un difusor de burbujeo. El inoculo algal fue del 10% v/v a una concentración de 1.7×10^6 cel ml^{-1} . El frasco está conectado hacia una matraz Erlenmeyer para la salida del aire con el fin de que el cultivo no se presuricé.



Figura 6. Reactor simple donde: 1 es la entrada para el aire, 2 Medio de cultivo con agitador y difusor de burbujeo y 3 salida del aire.



Figura 7. Reactor inoculado con las microalgas y puesto en marcha

Posteriormente las microalgas se resembraron en dos litros BBM en las condiciones antes mencionadas.

3.3 Origen y descripción del agua residual del efluente del digestor anaeróbico.

El efluente se colectó de la fosa de efluentes, donde se vierte la mezcla ya digerida por el biodigestor. El biodigestor es de flujo continuo, se encuentra a una altitud de 2,250 msnm, su clima se considera templado semiseco, con una temperatura media anual de 15,9 °C y una precipitación media anual de 686 mm. El sistema de alimentación del biodigestor (figura 8) consiste en un canal de conducción en donde se vierte el agua cada vez que se lava la sala de ordeña. En una fosa de mezclado en las cuales se agrega una carga de 300 litros de estiércol por día, el tiempo de retención es de 39 días, y la fosa de efluentes que no se le da ningún uso, lo que causa un problema de contaminación en esa zona.



Figura 8. Biodigestor de flujo continuo (parte superior) y fosa de efluentes (parte inferior)

La calidad del efluente del digestor anaeróbico (cuadro 6) se evaluó en tres periodos diferentes, el primer periodo fue en el mes de noviembre de 2011, el segundo en julio de 2012 y el tercer en enero de 2013, con el propósito de

conocer si el efluente era apto o no para el cultivo de las microalgas. El efluente se filtró con papel filtro (Whatman # 40), después se centrifugó a 6500 rpm durante 20 min. El sobrenadante se colocó bajo luz UV (Sankyo Denki Germinicida lamp ultraviolet) durante 20 min a 93 lux de intensidad a 10 cm de distancia.

Cuadro 6. Resultados de los análisis fisicoquímicos del efluente.

Parámetros	Periodo		
	Noviembre 2011	Septiembre 2012	Enero 2013
Nitrógeno amoniacal $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	85.0	101.5	90.0
Nitrato $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	nd	14.0	24.0
Fósforo total disuelto $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	9.6	16.3	3.4
pH	8.1	7.3	8.4
DQO $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	491.0	1,995.0	1700.0
Sólidos totales	nd	844.4	900.0
Sólidos volátiles	nd	389.0	250.0

nd= no determinado

Como se observa en el cuadro anterior la variación de los resultados por periodo son diferentes, debido a las fechas de recolección, además de la diferencia que pudo haber existido en el proceso de digestión del digestor y por consiguiente del efluente. Sin embargo, aunque existieron diferencias en el contenido de nutrientes en los tres periodos muestreados, el efluente sirvió como medio de cultivo para las microalgas. Stephanie *et al.*, 2007 describen en el efluente de un biodigestor agrícola concentraciones de nitrógeno amoniacal de $82.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $472 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ DQO, $96.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y DBO_5 , pH 6.6. Estrada *et al.* 2008 encontraron $189 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ DQO, $112 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ DBO_5 y pH 7.9. Wang y Lan (2011) obtuvieron en agua residual sintética, $12.3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NH_4^+ , $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de

NO_3 , $3\text{--}6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de P-PO_4^{-3} y $340\text{--}560\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de DQO; para desechos porcinos el contenido de NH_4^+ fue de $4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $788\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NO_3 , $40\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de P-PO_4^{-3} y $284\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de DQO,

En contraste, con los resultados obtenidos por Chen *et al.*, 2012 que obtuvieron del efluente de un digestor anaeróbico de desechos de vacas lecheras, el DQO de $30,100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, nitrógeno total ($3,200\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), fósforo total ($190\text{ mg P}\cdot\text{l}^{-1}$), además de un alto contenido de sólidos totales ($43,670\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y volátiles ($27,920\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

AQL (Aqualimpia, 2004) menciona que la composición de los residuos (aguas con excretas) es muy variable, dependiendo del sistema de producción (especie, edad de los animales, localización), alimentación, sistema de limpieza y condiciones de higiene. Lo que implica variabilidad del contenido de nutrientes en los diferentes tipos de agua residual.

3.4 Diseño experimental

En este trabajo se desarrollaron cuatro fases del cultivo de microalgas. La primera fase consistió en evaluar el crecimiento de las microalgas en medio BBM. El crecimiento celular se midió por conteo celular con cámara de Neubauer y densidad óptica a 750 nm con espectrofotómetro Marca Genesys. La segunda fase evaluó la adaptación de las microalgas hacia el efluente. Las microalgas fueron cultivadas en el efluente. La biomasa algal se inoculó al 10% v/v a 225 ml de agua residual, durante 45 días. Tres resiembras se realizaron cada 15 días. La evaluación del crecimiento algal fue por conteo celular y

densidad óptica a 750 nm durante los primeros 13 días. La fase tres consistió en determinar la capacidad de remoción de fósforo y DQO en el efluente por medio de las microalgas. Se evaluó el crecimiento celular, pH y contenido de lípidos durante 17 días. Los parámetros se determinaron cada tercer día. La cuarta fase evaluó la remoción de nutrientes en el cultivo (nitrógeno amoniacal, nitrato y fósforo), además pH y DQO, utilizando diferentes concentraciones de nitrógeno amoniacal (90, 50 y 25 mg·l⁻¹ de NH₄⁺). Asimismo la biomasa algal se calculó por concentración celular y sólidos volátiles. Por otra parte los lípidos totales y ácidos grasos fueron cuantificados. Dichos parámetros fueron evaluados diariamente durante 9 días.

3.5 Técnicas analíticas

Se realizó un análisis fisicoquímico al efluente para conocer su calidad midiendo:

3.5.1 Nitrógeno amoniacal (N -NH₃)

El nitrógeno amoniacal se determinó por el método 10031 (Hach, 2004). Los iones amoníaco se combinan con cloro para formar monocloraminas. Las monocloraminas reaccionan con ácido salicílico para formar 5-aminosalicílico. El 5-aminosalicílico es oxidado en presencia del nitroprusiato de sodio para formar compuestos de coloración azul. El color azul es enmascarado por el color amarillo formado por el exceso de reactivo presente, originando una solución con coloración verde. La reacción resultante se evalúa en el espectrofotómetro Hach modelo DR 4000 a 655 nm. En cada grupo de muestras se realizó un blanco con agua desionizada. En viales de 10 ml se

añadió 0.1 ml de muestra, se agregó el contenido del reactivo amonio salicilato y posteriormente el reactivo amonio cianurato. Los tubos se taparon para agitarlos invirtiéndolos de arriba hacia abajo para disolver los reactivos, el tiempo de reacción fue de 20 minutos, después de éste lapso de tiempo, se colocó el tubo blanco para tararlo a cero, y posteriormente se leyeron los tubos con la muestra en el espectrofotómetro. Los resultados fueron en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{N-NH}_4^+$.

3.5.2 Nitrato (N-NO_3)

La medición del nitrato se llevó a cabo por el Método 8039 (Hach, 2004). El Cadmio metálico reduce los nitratos en la muestra a nitrito. El ion nitrito reacciona en un medio ácido con ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio. Se forman parejas con sal y ácido gentísico para formar una solución de color ámbar. En cada grupo de muestras se realizó un blanco con agua desionizada. En las celdas se añadió 10 ml de muestra y se agregó el contenido del reactivo Nitrate Ver5 del kit y se esperó un minuto. Posteriormente se agitó de arriba hacia abajo la celda tapada dejando reposar 5 minutos para su lectura en el espectrofotómetro a 500nm. Cabe señalar que el blanco se prepara de igual manera antes de los 5 minutos de espera de reacción de las muestras. Al finalizar este lapso de tiempo, el blanco calibro el espectro para leer las muestras, cuya unidad fue en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{N-NO}_3$.

3.5.3 Fósforo total.

Para medir el fósforo total se empleó el Método 4500 P- D Cloruro estanoso (APHA, 1998). El método se basa en que los ortofosfatos en presencia de molibdato de amonio reaccionan para formar ácido molibdofosfórico que es

reducido por el cloruro estanoso para formar un compuesto de molibdeno, que da una coloración azul intensa. La concentración de fósforo es leída espectrofotométricamente a 690 nm.

Se utilizaron dos disoluciones: la de cloruro estanoso que consiste en agregar 2.5 g de cloruro estanoso dehidratado a 100 ml de glicerol. Se calentó a baño maría y se agitó con una varilla de vidrio.

La disolución de heptamolibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se preparó de la siguiente manera: se disolvieron $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de reactivo en 75 ml de agua destilada, por otra parte con mucho cuidado se agregó 280 ml de ácido sulfúrico a 400 ml de agua destilada, se dejó enfriar. Posteriormente se agregó el heptamolibdato y se aforó a 1 litro.

Antes de realizar las determinaciones se realizó una curva de calibración correspondiente. La curva de calibración se elaboró cada vez que se prepararon nuevas soluciones de cloruro estanoso y heptamolibdato. Se elaboró con una solución madre de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) de $1,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, y se prepararon estándares de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Con los estándares ya preparados, se agregó en un matraz los reactivos en el siguiente orden y cantidad:

A 100 ml de estándar, se le adicionó 4 ml de la disolución de heptamolibdato de amonio y 0.5 ml de disolución de cloruro estanoso en agitación. Después de 10 minutos de reacción se desarrolla un color azul, posteriormente se lee a 690 nm en el espectrofotómetro. El blanco fue agua destilada. Las muestras se

analizaron con el mismo protocolo. Con la finalidad de tener las concentraciones dentro de la curva de calibración se realizó una dilución 1:100 en agua destilada.

3.5.4 pH

El pH se midió con un potenciómetro (Thermo Scientific Orion 5 Star), el cual cuenta con un electrodo de membrana de vidrio (Thermo Scientific Orion 8102BNUWP) y compensador de temperatura (Thermo Scientific Orion 927005MD).

El potenciómetro fue calibrado con tres soluciones buffer (Thermo Scientific Orion 910104, 910107, 910110) de pH 4.01, 7.00 y 10.01 a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. El pH se midió inmediatamente después de haber sacado la muestra sumergiendo el electrodo. Tomando en cuenta que entre cada medición se lavó el electrodo con agua destilada evitando la contaminación cruzada.

3.5.5 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO es obtenida por la oxidación de los residuos con una solución ácida de dicromato. Este proceso oxida todos los compuestos orgánicos a dióxido de carbono y agua.

Se empleó la técnica 5200 B de reflujo cerrado (APHA, 1998) con modificaciones de los volúmenes de reactivos que se agregaron a la muestra, utilizando como oxidante una solución del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) a una concentración de ($10.216\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) con Sulfato Mercúrico ($HgSO_4$) a una

concentración de ($33.3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y como catalizador una solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico ($\text{Ag}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$), a una concentración de 15 gramos de $\text{Ag}_2\text{SO}_4\cdot\text{l}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$. El almacenamiento del catalizador fue en un frasco de vidrio color ámbar ya que esta solución se altera con la presencia de luz.

Para realizar las determinaciones se realizó una curva de calibración correspondiente. La curva de calibración se elaboró cada vez que se prepararon nuevas soluciones de oxidante y catalizador. Se elaboró con una solución madre de biftalato de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) de $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y se prepararon estándares de (50, 100, 200, 300, 400 y $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Con los estándares ya preparados, se agregó en un tubo de reacción limpio, seco y sin rayas 1.5 mL de la solución de digestión de alta concentración, posteriormente se agregó 2.5 mL de solución estándar de biftalato a las diferentes concentraciones, continuamente se adicionó 3.5 mL de solución catalizadora. A continuación se selló el tubo de reacción con teflón y se agitó suavemente cinco veces para mezclar los reactivos, teniendo cuidado de que no existieran fugas de líquido. Para el blanco se ocupó agua destilada, finalmente los tubos se llevaron al equipo de digestión (Hach DRB 200), a una temperatura de 150°C por 120 minutos. Al finalizar la digestión las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se limpiaron los tubos y se leyeron a 600 nm de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Genesys 10uv) ajustado a cero con el blanco.

Se graficó absorbancia contra concentración para la construcción de la curva y se obtuvo la ecuación de la recta que se muestra en la ecuación 1.

$$y = 0.0004x - 0.0028$$

Ec.1

En donde y es la absorbancia y x es la concentración de DQO en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Para el análisis de las muestras se siguió el procedimiento anterior, tomando en cuenta que en lugar de agregar estándar se agregó la muestra a analizar. La muestra se diluyó 1:100.

3.5.6 Determinación de Sólidos.

Para la determinación del perfil de sólidos totales (ST) en el que se involucran todo tipo de sólidos tanto disueltos como volátiles, se utilizó la técnica 2540 B (APHA, 1998). Se manejaron crisoles con capacidad de 10 ml, los cuales se pusieron a peso constante (se refiere a que la diferencia de peso no debe variar a más de 5 mg), para esto se introdujeron los crisoles a una estufa (Boekel Scientific 107905) a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, después de estos 15 minutos el crisol se pasó a una mufla (Felisa FE-361) a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, los crisoles se pasaron a la estufa nuevamente por 20 minutos y después a un desecador que contenía sílica gel, para enfriarse a temperatura ambiente, se pesó el crisol y se registró su peso como peso del crisol en una balanza analítica, este procedimiento se repitió hasta que el peso del crisol no varió en más de 5 mg.

Con el crisol a peso contante, se colocó 3 ml de muestra homogenizada y se llevó a una placa de calentamiento (Corning PC-351) hasta sequedad evitando que la muestra se quemara y tuviera una ebullición violenta. Una vez que se llegó hasta la sequedad con ayuda de unas pinzas para crisol se llevó a la

estufa a 105°C por una hora, transcurrido este tiempo el crisol se introdujo en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, se pesó en la balanza analítica y se registró el peso como peso del crisol a 105°C (PC). Por otra parte para medir los sólidos fijos, el crisol pesado anteriormente con la muestra se colocó en mufla a 550°C por 15 minutos, pasado este tiempo se trasladó el crisol a la estufa a 105°C por un periodo de 20 minutos y se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, se pesó y registro el peso como PC a 550°C.

Los sólidos volátiles corresponden a la fracción de los ST, es decir a la fracción orgánica de la muestra, se determinaron por medio de la diferencia de los sólidos fijos (SF). Se utilizó la técnica 2540 (APHA, 1998).

Los resultados se pueden obtener con ayuda de las siguientes ecuaciones:

$$ST = PC - PC\ M / volumen\ de\ la\ muestra * 1x10^6 \quad Ec.2$$

$$SF = PC\ a\ 550^{\circ}C - PC\ M / volumen\ de\ la\ muestra * 1x10^6 \quad Ec.3$$

Los sólidos volátiles fueron calculados por la diferencia de ST y SF, con la siguiente ecuación:

$$SV = (ST - SF) \quad Ec.4$$

En donde:

ST= Sólidos totales.

SF = Sólidos fijos

SV = Sólidos volátiles reportados

PC= peso de crisol a 105 °C.

PC a 550°C = peso del crisol 550°C,

PC M= peso del crisol más la muestra.

Es necesario mencionar que los pesos de los crisoles están en gramos, el volumen de muestra reportado en ml, y el factor de conversión es 1000000 (1×10^6). Los resultados de los sólidos son reportados en $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.6 Condiciones de cultivo

El cultivo de las microalgas se desarrolló en matraces con un volumen de operación de 250 ml, siendo 225 ml de efluente y 25 ml de inóculo de microalga. Se mantuvo en agitación mecánica con una incubadora orbital (Thermo Scientific, modelo Max 4450) operando a 150 rpm. Se iluminó con luz blanca (lámpara de 8 w) a una intensidad de 4590 lux medido con un luxómetro (Stereon No. Her410), sin fotoperiodo.

3.7 Remoción de nutrientes

Para la evaluación de remoción de nutrientes, pH y DQO se emplearon las técnicas de la sección 3.5

Por otra parte, cabe señalar que las concentraciones del ion NH_4^+ y NH_3 son dependientes del pH y temperatura. Por lo tanto se realizó un ajuste del porcentaje del ion NH_3 que se volatilizó a causa de estos factores utilizando la ecuación 5 (Clement y Merlin, 1995), para que los resultados de remoción de nitrógeno amoniacal evaluados en el cultivo solo fueran por la asimilación de las microalgas.

$$\text{ión no ionizado } NH_3(\%) = \frac{100}{(1+10^{(pKa-pH)})} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde el pKa de la relación NH_4^+ y NH_3 es de 9.25 y los valores del pH son de acuerdo a las mediciones realizadas durante el experimento. Este ajuste sólo se realizó para la remoción de nitrógeno amoniacal.

El porcentaje de remoción de los nutrientes y DQO fueron determinados mediante la ecuación 6 (Zhang *et al.*, 2012).

$$\text{Remoción de nutriente } (\%) = \frac{Sp_0 - S_{pt}}{Sp_0} * 100 \% \quad \text{Ec. 6}$$

Donde Sp_0 ($mg \cdot l^{-1}$) es la concentración de nitrógeno amoniacal, nitrato, fósforo total y DQO en el tiempo 0 (día) y S_{pt} ($mg \cdot l^{-1}$) es la concentración de nitrógeno amoniacal, nitrato, fósforo total y DQO en el tiempo t (día).

La constante de la cinética de remoción (k) de nitrógeno amoniacal y nitrato fue calculada en la fase de decrecimiento exponencial de acuerdo a la ecuación 7.

$$X_t = X_0 e^{-kt} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde X_0 y X_t indican la concentración de nutrientes en el cultivo del alga al principio y en el tiempo t de la fase exponencial respectivamente. A la ecuación se le aplicó mínimos cuadrados. Este método estima los parámetros desconocidos en un modelo de regresión lineal, que minimiza la suma de cuadrados de las distancias verticales entre las respuestas observadas en el conjunto de datos y las respuestas predichas por la aproximación lineal.

3.8 Evaluación de biomasa algal.

3.8.1 Concentración celular

El conteo celular se determinó mediante conteo directo en cámara de Neubauer con microscopio de luz, utilizando el objetivo 40X debido al tamaño de las células de *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.*

La cámara de Neubauer está comprendida por nueve cuadrantes, cada uno de ellos de 1 mm^2 de superficie, los cuales a su vez presentan subdivisiones en distintos niveles (Figura 9). Para la determinación de la concentración celular de una muestra dada, es recomendable contar, por duplicado, los cuatro cuadrantes grandes ubicados en las esquinas de la cámara, contando así un total de ocho cuadrantes. El promedio de los ocho cuadrantes cuantificados, nos indica el número de células promedio presentes en 1 mm^2 ; considerando que la profundidad de la cámara es de 0.1 mm , el volumen en el cual están comprendidas las células cuantificadas es de 0.1 mm^3 , es decir, de 0.1 uL . Por tanto, para determinar el número de células presentes en un volumen de 1 ml de cultivo es necesario multiplicar el número promedio de células contabilizadas por cuadrante (a-d) dividiéndolo por cuatro. Para obtener la concentración en células $\cdot \text{ml}^{-1}$, se multiplica por un factor de conversión de 1×10^4 .

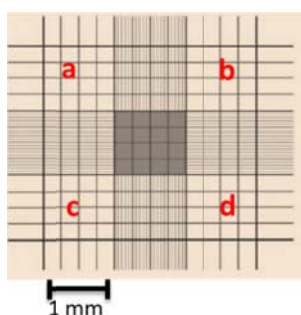


Figura 9. Cámara de Neubauer.

Cabe destacar que, en caso de que la concentración celular del cultivo sea elevada ($> 10^4$ células· ml⁻¹), resultará necesario diluir la muestra; para este propósito, se recomienda emplear una solución de NaCl al 0.85% (w/v). El factor de dilución por el cual la muestra es diluida, debe ser considerado en el cálculo de la concentración celular. De este modo, el cálculo de la concentración celular se realiza acorde con la ecuación 8 (Garibay et al., 2012):

$$\text{Concentración celular (células ml}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{células promedio}) \cdot (\text{Dilución}) \cdot 10^4}{1(\text{ml})} \quad \text{Ec.8}$$

El análisis de productividad de las microalgas en términos de peso seco, lípidos y densidad celular se determinan por medio de la ecuación 9 y 10 (Feng et al., 2012).

$$P_i = C_{fi} - C_{0i} \quad \text{Ec. 9}$$

Donde P_i esta dado en g·l⁻¹, i es el peso seco y lípidos. En la densidad celular i es el número de células contado en cel·ml⁻¹, C_{fi} es la concentración del compuesto i (g·l⁻¹) o cel·ml⁻¹ en el caso de densidad celular, y C_{0i} es la concentración inicial del compuesto.

$$Q_i = P_i / t_f \quad \text{Ec. 10}$$

Q_i es la productividad volumétrica en g·l⁻¹·d⁻¹, en densidad celular la unidad es cel·ml⁻¹·d⁻¹, donde t_f es el tiempo total del cultivo.

3.8.2 Sólidos totales y volátiles

Los sólidos totales y volátiles se determinaron de acuerdo a la sección de técnicas analíticas.

3.9 Evaluación de lípidos totales

La obtención y cuantificación de lípidos totales se fundamenta en un procedimiento de extracción con solventes (Vazquez-Duhal y Greppin 1987; Band *et al.*, 1992), seguido de un análisis gravimétrico. Se colectaron 30 ml del cultivo de las microalgas, y se procedió a realizar las etapas descritas a continuación:

Cosecha de las células: Se centrifugó la muestra de cultivo microalgal a 10,000 rpm, 15 min, 4 °C y se desechó el sobrenadante.

Extracción lipídica. Se resuspendió la pastilla celular en 2 ml de metanol (MeOH) y 1 ml de diclorometano (CH_2Cl_2) con BHT (butil-hidroxitolueno) al 0.05% (0.5 g/l). De este modo, las células están inmersas en una mezcla MeOH: CH_2Cl_2 2:1. Se agitaron las muestras vigorosamente con ayuda de un vortex, se taparon y se dejaron en refrigeración (4 °C) durante un periodo mínimo de 12 h. Posteriormente se separó el paquete celular de la mezcla MeOH: CH_2Cl_2 mediante centrifugación (10,000 rpm, 15 min, 4 °C). Con el fin de completar la extracción lipídica, se lavó la pastilla celular en dos ocasiones empleando en cada una de ellas 4 ml de mezcla MeOH: CH_2Cl_2 1:1. En cada lavado, se agito vigorosamente los solventes junto con el paquete celular y se centrifugo bajo las condiciones mencionadas. Se retiró sobrenadante resultante (extracto) y se combinó con los procedentes de los otros lavados, de manera tal que el volumen final de extractos recolectado fuera de 11 ml.

La fase MeOH:CH₂Cl₂ (orgánica), comprendida por los extractos recolectados, fue empleada para finalizar la extracción y análisis del contenido de lípidos totales. Con el propósito de romper el equilibrio de la mezcla MeOH:CH₂Cl₂, se adicionó 11 ml de H₂OmQ (o agua desionizada), se agitó vigorosamente y se centrifugó (10,000 rpm, 15 min, 4 °C). De este modo, se obtienen dos fases: la orgánica (inferior) que contiene los lípidos disueltos en el CH₂Cl₂, y la fase acuosa (MeOH-H₂O; fase superior). Se separó la fase orgánica y se lavó la fase acuosa una vez más con 3 ml de CH₂Cl₂; se mezclaron las fases orgánicas recolectadas y se desechó la fase acuosa.

Cuantificación de lípidos totales: Como la muestra obtenida fue escasa, para eliminar el contenido de CH₂Cl₂ y agua, la muestra se dejó evaporar en un desecador por 48 h. Después de este periodo de tiempo en el vial sólo quedaron los lípidos extraídos de las microalgas. Cabe mencionar que los viales donde se colocaron los lípidos estaban a peso constante, para ello se colocaron en la estufa a 105°C durante 2 h, posteriormente se pusieron en el desecador durante 15 min y se pesaron (el peso constante se refiere a que la diferencia de peso no varió a más de 5 mg).

Para la determinación del contenido de lípidos totales se empleó la ecuación 11.

$$\text{Lípidos} \left(g \frac{\text{lípidos}}{L} \right) = \frac{(W_{\text{vial+muestra}}(g)) - (W_{\text{vial}}(g))}{V_{\text{muestra}}(L)} \quad \text{Ec. 11}$$

En donde W_{vial} es el peso del vial a peso constante, $W_{\text{vial} + \text{muestra}}(g)$ es el peso del vial más la muestra de lípidos extraídos de las microalgas y $V_{\text{muestra}}(L)$ es el volumen utilizado del cultivo.

3.9.1 Procedimiento para evaluar la composición de ácidos grasos

Ya obtenidos los lípidos totales, el procedimiento para estimar el perfil de ácidos grasos se determinó de acuerdo al método MGA 0241 de FEUM (2008), llevando a cabo un pretratamiento para esterificar los ácidos grasos libres que pudieran estar presentes.

A una muestra de $0.18 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de lípidos, se le agregaron 1.5 ml de MeOH y 0.1 ml de H_2SO_4 y se sometió a reflujo por 2 h a 65°C . La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación, se adicionaron 20 ml de CH_2Cl_2 y la fase orgánica se lavó con agua destilada (3X10 ml). En el último lavado se midió el pH para asegurar la eliminación completa del ácido sulfúrico. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en baño de vapor para eliminar el cloruro de metileno. Posteriormente esta muestra pretratada fue sometida a una reacción de transesterificación colocándola a reflujo (2.5 h, con agitación constante) en 0.25 ml de una mezcla al 4 % m/v de KOH en metanol. El seguimiento de la reacción de transesterificación se hizo mediante cromatografía en capa delgada utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo/ácido acético (9:1:0.1) y revelando con yodo. Al término de la reacción la mezcla se disolvió con hexano (20 ml) y se lavó con agua destilada (3X5 ml). Para eliminar el KOH de la muestra se lavó con ácido cítrico al 0.1 % (3X5 ml) tres veces más con 5 ml de agua destilada. Finalmente la muestra se secó con sulfato de sodio anhidro y se pasó a través de gel de sílice para eliminar clorofilas y se evaporó. La muestra obtenida se analizó por cromatografía de gases en un cromatógrafo (Agilent 6890), por el Método de

FAME; las condiciones del equipo fueron con detector de ionización de flama; columna ColFAME 30 m x .25 mm, 0.25 um espesor de película; gas acarreador hidrógeno 40 psi Split 20, con velocidad de flujo 1.8 ml/min; temperatura detector 275 °C e inyector 250°C, el horno temperatura inicial 180°C 15 min, 10 min temperatura final 230°C, tiempo de lectura 23 min.

3.10 Análisis estadístico

Las variables nitrógeno amoniacal, nitrato, fósforo, pH, concentración celular y sólidos totales volátiles se sometieron a un análisis de varianza., considerando un diseño completamente al azar. Se realizó la prueba de Tukey para comparación de medias con el programa SAS 9.0 empleando un 95% de confiabilidad. Se utilizó el programa Matlab 6.0 para calcular la tasa de remoción de los nutrientes.

CAPÍTULO

4

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Mantenimiento de las microalgas

Con la finalidad de preservar las microalgas, mantener cultivo fresco y escalar la cantidad de biomasa, *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* fueron adaptadas a medio BBM. Cabe señalar que *Neochloris oleoabundans* había sido crecida en medio BBM en tanto que *Chlorella sp.* estaba acondicionada para crecer en agua residual.

La adaptación al medio BBM fue realizada en tres etapas. La primera etapa consistió en un cultivo de 150 ml en medio BBM durante 10 días, enseguida se reinoculó en un litro de medio durante 27 días y finalmente la biomasa se reinoculó en dos litro de medio durante 21 días.

Los resultados se muestran en la figura 10. Se observa en la primer etapa (figura a₁ y b₁), que el conteo celular así como la densidad óptica de *Chlorella sp.* tuvieron un menor crecimiento que *Neochloris oleoabundans*. La producción celular de *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* fue de $8.65 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $1.94 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente. El crecimiento celular de *Neochloris oleoabundans* aumentó de $3.3 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1.2 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y de *Chlorella*

sp. fue 2.5×10^5 cel·ml⁻¹ a 4.5×10^5 cel·ml⁻¹. Cabe señalar que *Chlorella sp.* tuvo una disminución de biomasa del tercer al sexto día, posiblemente por lisis celular durante la adaptación del cultivo a un medio diferente. Sin embargo, se encontraron pocos reportes de crecimiento celular de *Chlorella sp.* cultivada en medio BBM. Bertoldi *et al.* (2008) reportó que *Chlorella sp.* obtuvo una densidad celular de 10.1×10^6 cel ml⁻¹ al séptimo día, en contraste con los resultados obtenidos por Rodas *et al.*, 2012 quienes obtuvieron un crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* de 1.08×10^7 cel·ml⁻¹ al séptimo día. Los resultados obtenidos de densidad óptica mostrados en la figura 10b₁ para *N. oleoabundans* fueron de 0.417 de absorbancia y para *Chlorella sp.* fueron de 0.199.

En contraste, en la etapa dos ambas microalgas crecieron, sin embargo la velocidad de crecimiento y concentración final alcanzada fueron diferentes. El crecimiento celular fue de 49×10^6 cel ml⁻¹ en *N. oleoabundans* al día 14, como se muestra en la figura 10a₂, estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Popovich *et al.* (2012) quienes obtuvieron una densidad celular de 40×10^6 cel ml⁻¹ al octavo día cultivada en agua de mar. Por otra parte *Chlorella sp.* obtuvo un crecimiento de 6.5×10^6 cel ml⁻¹, estos resultados fueron menor a los reportados por Rodas *et al.*, 2012 que obtuvieron crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* de 1.43×10^7 cel ml⁻¹ al tercer día. La densidad óptica aumentó de 0.041 a 0.966 de absorbancia en *N. oleoabundans* y de 0.033 a 0.455 de absorbancia en *Chlorella sp.* como se muestra en la figura 10b₂.

Finalmente en la tercera etapa, el crecimiento celular en ambas microalgas tuvo el mismo comportamiento en conteo celular y densidad óptica. En la figura 10a₃

se muestra el crecimiento celular en ambas especies. *N. oleoabundans* mostró un crecimiento de 6.8×10^6 cel ml^{-1} , mientras que *Chlorella sp.* obtuvo 6.4×10^6 cel ml^{-1} . La densidad óptica fue de 0.501 de absorbancia para *N. oleoabundans* y 0.308 para *Chlorella sp.*

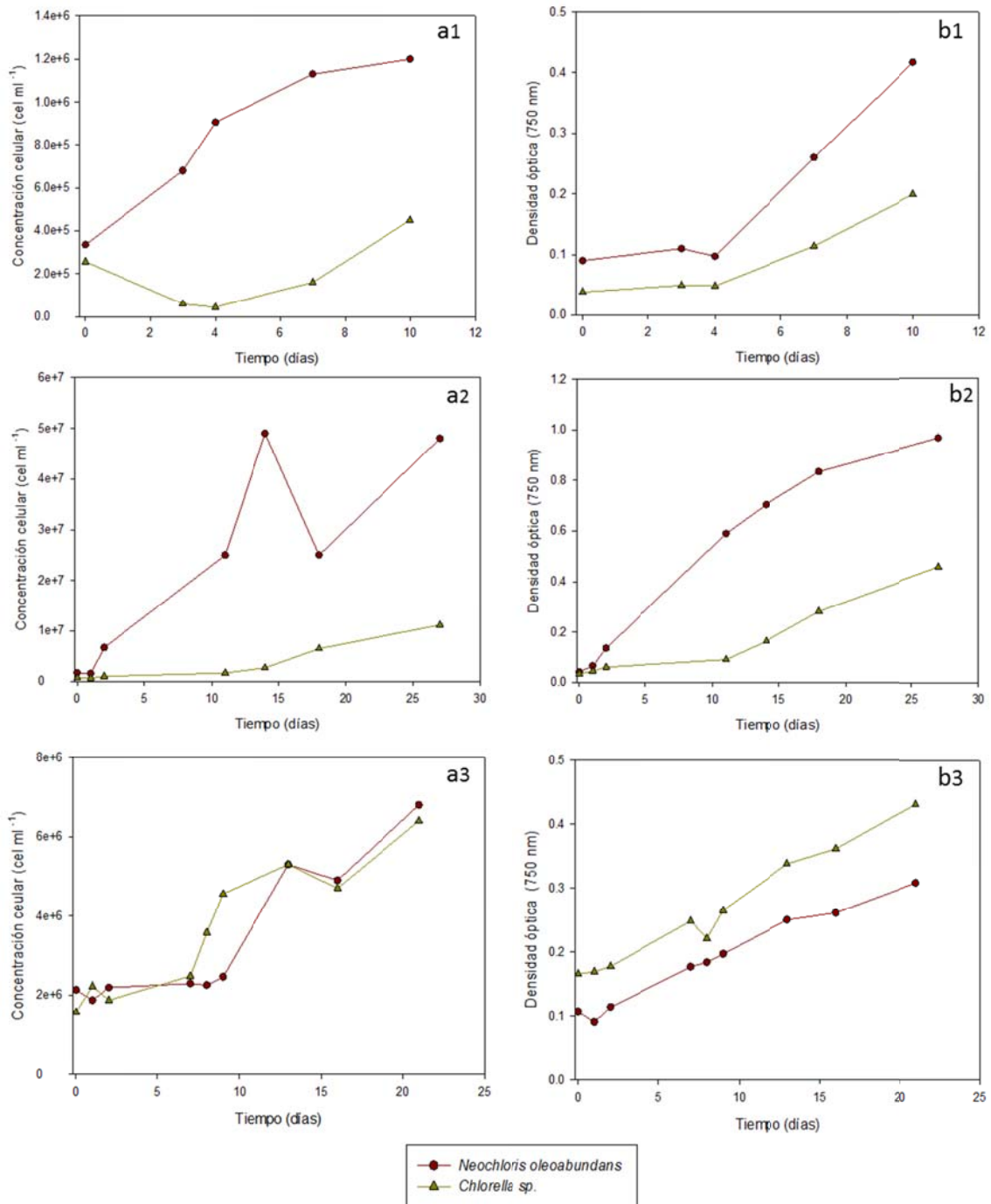


Figura 10. Densidad celular de *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivadas en BBM. Inicio de adaptación a1) conteo celular, b1) densidad óptica; segunda etapa a2) conteo celular; b2) densidad óptica; tercera etapa a3) conteo celular, b3) densidad óptica.

4.2 Adaptación de las microalgas al efluente

Las microalgas una vez adaptadas al medio BBM fueron utilizadas para remover nutrientes del agua residual. El crecimiento celular de *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* se muestran en la figura 11a. *Neochloris oleoabundans* tuvo una oscilación del crecimiento porque al inicio se inocularon $6 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y descendió al sexto día, sin embargo, aumento su densidad celular a $6.4 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al séptimo día. *Chlorella sp.* se inoculó con $3.6 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ y al quinto día decreció a $1.3 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, posteriormente se incrementó su crecimiento a $1.06 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al día once. Esta oscilación de crecimiento se debió a la adaptación fisiológica o de selección, porque la población crece muy lento o puede no ocurrir. Cabe resaltar que estas microalgas estaban cultivadas en medio BBM. Éste contenía todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de las microalgas, como se observó en la fase de preservación de las microalgas donde *N. oleoabundans* llego a crecer hasta $49 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$. El medio BBM estaba libre de bacterias en comparación con el agua residual, ya que las bacterias compiten por los nutrientes que contiene el agua residual. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron mayores a los reportados por Bertoldi *et al.*, 2008 quienes cultivaron a *Chlorella vulgaris* en agua residual de hidroponía y obtuvieron un crecimiento celular de $5.7 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$.

El resultado de densidad óptica en el cultivo de *Neochloris oleoabundans* fue de 0.149 de absorbancia al inició, incrementándose a 0.167 al séptimo día; *Chlorella sp.* obtuvo una absorbancia inicial de 0.131 incrementándose a 0.234

al onceavo día como se observa en la figura 11b; observando que la adaptabilidad de las microalgas se presenta en los primeros once días, posteriormente se inicia un lento crecimiento y decrece al treceavo día debido al agotamiento de los nutrientes, esto sugiere un alimentación semicontinua. Un sistema semicontinuo de alimentación es mejor por el rápido crecimiento de algal que un sistema discontinuo, sin embargo, después de cuatro ciclos semicontinuos el crecimiento celular disminuye debido a un colapso en el cultivo (Ruiz-Marín *et al.*, 2010)

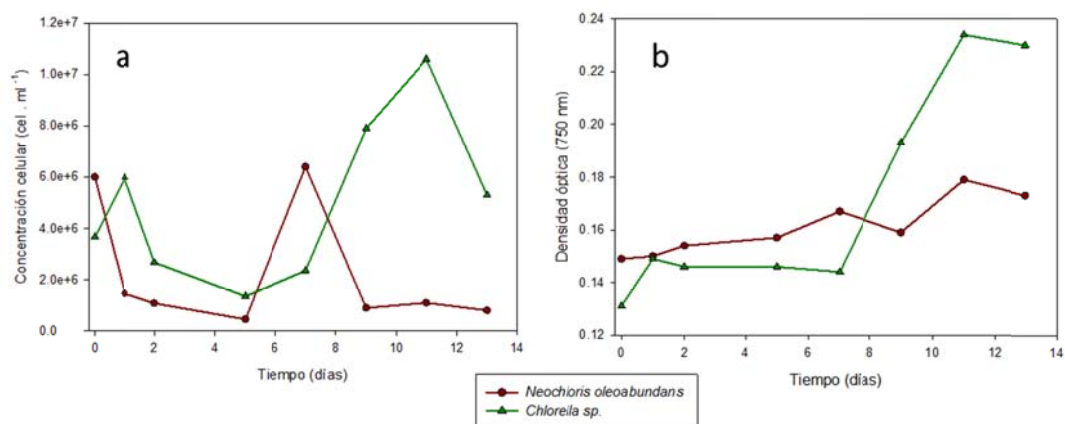


Figura 11. Crecimiento celular de *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivadas en agua residual del efluente de un digestor anaeróbico. a) Concentración celular y b) densidad óptica.

4.3 Experimentación previa de remoción de nutrientes.

Una vez adaptadas las microalgas al agua residual se procedió a evaluar la capacidad de remoción de fósforo, DQO y potencial para generar biomasa. Los resultados obtenidos en remoción de fósforo se muestran en la figura 12, una fluctuación en la remoción se observa en ambas especies, *Neochloris oleoabundans* removió el 100% de fósforo al tercer día; sin embargo a partir del séptimo día se notó presencia de fósforo 2.21 mg·l⁻¹ P, incrementándose hasta el treceavo día con 11 mg·l⁻¹ P. Al final del periodo de evaluación el cultivo tenía

8.97 mg P·l⁻¹. *Chlorella sp.* removió el 100% de fósforo al séptimo día; en días posteriores la cantidad de fósforo en el cultivo llegó a 11.81 mg P·l⁻¹.

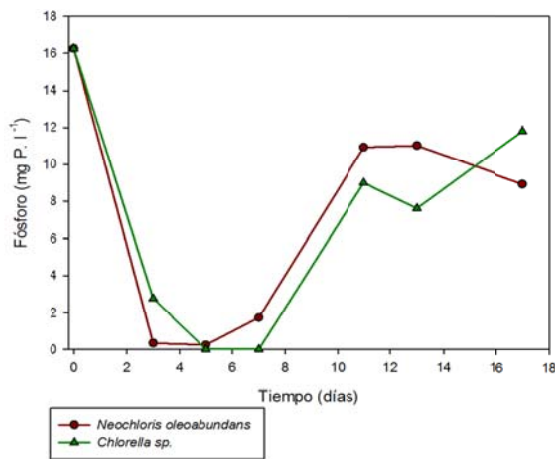


Figura 12. Remoción de fósforo por *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivadas en agua residual.

Li *et al.*, 2011 obtuvieron una remoción de fósforo menor a la reportada en este trabajo. Ellos obtuvieron una remoción de 79%, es decir 215 a 45.1 mg P·l⁻¹ en agua residual esterilizada y un 80.9% (212 a 40.4 mg P·l⁻¹) en agua residual cruda durante los primeros cuatro días de cultivo. Andrade *et al.*, 2006 obtuvieron una disminución de P-PO₄⁻³ en medio de cultivo durante los primeros 4 días de iniciado su bioensayo, con una remoción del 62, 50.5, 42.1 y 46.2% en B1, B2, B3 y el control respectivamente del efluente de maduración secundaria de una planta de tratamiento de agua residual municipal; al final del experimento observaron una remoción del 73.5 y 50% en B1 y control. También observaron presencia de P-PO₄⁻³ después del cuarto día, quizás causado como producto de lisis celular de la microalga y bacterias asociadas a los cultivos de B2 y B3. Wang *et al.*, 2009 mostró eliminación de fósforo en un 83.2, 90.6 y 85.6 % en aguas residuales del punto 1, 2 y 4 respectivamente

del flujo de una planta de tratamiento municipal, y sólo el punto 3 eliminó el 4.7% de fósforo.

Los resultados obtenidos en la remoción de la demanda química de oxígeno en el cultivo de *N. oleoabundans* fueron del 100% al onceavo día, mientras que *Chlorella sp.* solo removió el 90% (figura 13).

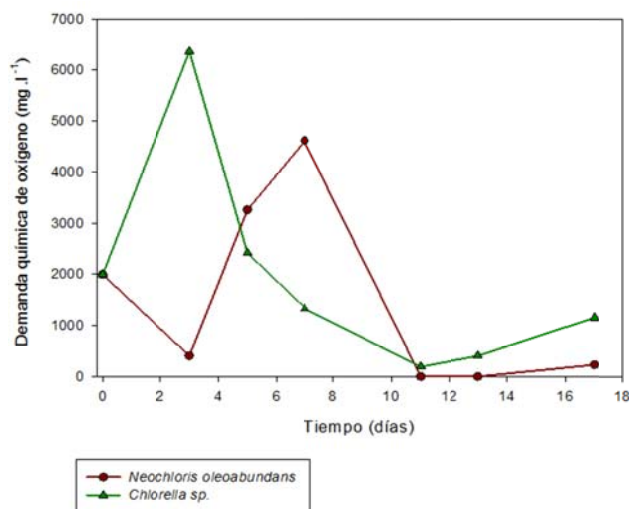


Figura 13. Remoción de DQO por *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivadas en agua residual.

Las microalgas fueron capaces de remover fósforo y DQO; asimismo la densidad celular máxima al onceavo día en cultivo de *N. oleoabundans* fue de $1.67 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ como se muestra en la figura 14 a, y *Chlorella sp.* obtuvo un crecimiento de $1.39 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$. La producción celular de *N. oleoabundans* fue de $1.23 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ y de *Chlorella sp.* fue $1.27 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los resultados obtenidos de biomasa alga medida en sólidos totales fueron de $1666.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y $1866.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* respectivamente, al séptimo día como se muestra en la figura 14 b. La productividad de biomasa fue $27.45 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en ambas microalgas al final del experimento. Wang y Lan (2011) obtuvieron $0.31 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ de *N. oleoabundans*

cultivada en agua residual municipal en una concentración de $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaNO_3 . Wang et al. (2010) obtuvieron $81.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de biomasa en peso seco, estimado en biomasa de $1.7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ después de 21 días de cultivo de *Chlorella sp.* en agua residual de desechos lácteos diluida al 25 %.

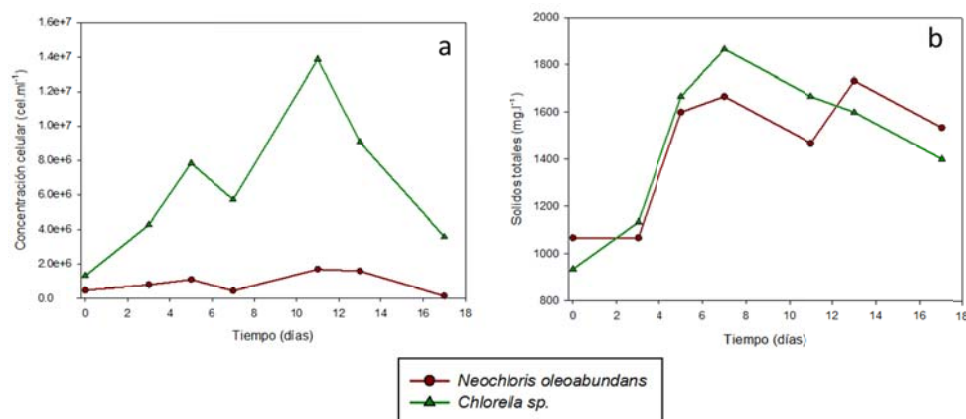


Figura 14. Densidad celular de *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivada en agua residual. a) Conteo celular y b) peso seco con base en sólidos totales.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de lípidos totales por unidad de peso seco fueron de $0.15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $0.16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* respectivamente.

4.4 Remoción de nutrientes en el efluente

Una vez observada la capacidad de remoción de fósforo y DQO por las microalgas en el efluente, se procedió a evaluar la remoción de nitrógeno amoniacal, nitrato, fósforo, además de monitorear pH, y remoción de DQO en el efluente a diferentes concentraciones de nitrógeno amoniacal (90 , 50 y $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Además se evaluó la producción de biomasa algal por conteo celular y sólidos volátiles, así mismo se cuantificó el contenido de lípidos totales y ácidos grasos.

4.4.1 Remoción de nitrógeno amoniacal

El proceso de eliminación de nitrógeno amoniacal, se observa en la figura 15a. *Neochloris oleoabundans* removió el 93.6 %, es decir de una concentración de 79.4 redujo a 5.0 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺ en el tratamiento de 90 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺. En la concentración de 50 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺ removió el 72.6% (de 62.1 a 17.0 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺) y en 25 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺ fue el 45.3% (de 33.4 a 18.2 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺), sin embargo no hay diferencias significativas ($P=0.05$) entre los tratamientos de 90 y 50 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺. Se observó que el nitrógeno amoniacal se eliminó en la concentración más alta. Levine *et al.* (2011) evaluó la remoción de N-NH₄⁺ por *Neochloris oleoabundans* cultivada en medio BBM a diferentes concentraciones, obteniendo una velocidad de remoción de 5 mg·l⁻¹d⁻¹ en concentraciones de 50 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺. La remoción determinada por *Chlorella sp.* fue del 73%, es decir de 82.2 a 22.2 mg·l⁻¹de nitrógeno amoniacal en concentración de 90 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺, para la concentración de 50 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺, eliminó 45 % (60.2 a 33.1mg·l⁻¹ N-NH₄⁺) y en 25 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺ removió el 40.3% (de 30.0 a 17.9 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺) como se observa en la figura 15b; los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Andrade *et al.*, 2006 quienes mostraron que *Chlorella sp.* obtuvo un crecimiento en condiciones autotróficas (control) como en condiciones mixotróficas (agua residual), en cultivos B3 (efluente de maduración secundaria de una planta de tratamiento de agua residual municipal) obteniendo una remoción de 100% de N-NH₄⁺ al segundo día de iniciado el experimento. Wang *et al.* (2009) evaluaron el crecimiento de *Chlorella sp.* en aguas residuales de cuatro puntos diferentes del flujo de un proceso de tratamiento de aguas residuales de una planta de

tratamiento municipal y obtuvieron un 82.4, 74.7 y 78.3% en la eliminación de N-NH_4^+ en aguas residuales del punto 1, 2, y 4, respectivamente. Li *et al.*, 2011 mostró que *Chlorella sp.* removi6 el 93 % de nitr6geno amoniacal, es decir de 85.9 a 6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ en agua residual esterilizada y 82.5 a 5.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (93.9%) en agua residual cruda. Su *et al.* (2012) observ6 la capacidad de diferentes microalgas para eliminaci6n de nitr6geno amoniacal en agua residual, obteniendo que *Phormidium sp.*, *C.reinhardtii*, *C.vulgaris* y *S. rubescens*, eliminan el 98% dentro un rango de 2-6 d6as depende de la especie. Li *et al.* (2012) sugirieron que la principal forma de nitr6geno inorg6nico en el efluente es nitr6geno amoniacal; las algas eliminaron el 40% en muestras diluidas de un efluente de desechos de 6cido c6trico dentro del periodo de crecimiento de cuatro d6as. Este fen6meno mostr6 que las microalgas prefieren utilizar amonio primero, aun cuando est6n disponibles los nitratos y nitrito (Li *et al.*, 2010; P6rez-Garc6a *et al.*, 2011).

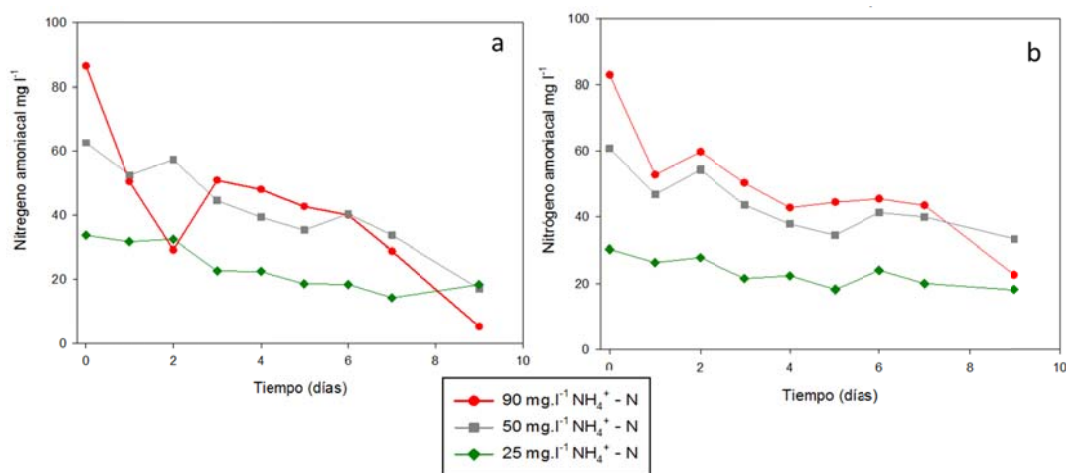


Figura 15. Eliminaci6n de nitr6geno amoniacal del agua residual por cultivos de: a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.* en concentraciones de 90,50, 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-NH_4^+ .

4.4.2 Remoción de nitrógeno nítrico

La remoción de nitrato en *Neochloris oleoabundans* fue de 59.1% al tercer día en la concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N- NH}_4^+$ (figura 16a), es decir de 20 a $8.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ sin embargo, a partir del cuarto día la presencia de nitrato fue de 13 a $41.8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_3^-$. En los otros dos tratamientos tuvieron una remoción similar al anterior. El aumento del contenido de nitrato se debió al aumento del pH en el segundo día (figura 17). El aumento y constancia del pH es debido a la actividad fotosintética de las algas (Oswald, 1988), además de la nitrificación provocada por el crecimiento de bacterias fototróficas (Su *et al.*, 2012). Las microalgas de agua dulce son capaces de crecer en condiciones ácida y alcalina como una respuesta adaptativa al ambiente fluctuante, a pesar de que su pH óptimo sea 8 (Goldman *et al.*, 1982). Wang y Lan (2011) observaron eliminación de NO_3^- cuando aumentó la concentración inicial de NaNO_3 $43.7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $140 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en cultivos en agua residual de *Neochloris oleoabundans*.

Chlorella sp. eliminó el 72.5% de NO_3^- al tercer día, de 24.06 a $6.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NO}_3^-$, como se observa en la figura 16b, en el tratamiento de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$. Los otros dos tratamientos tuvieron un comportamiento similar al anterior. Chinnasamy *et al.* (2010) en el trabajo que realizaron sobre un consorcio nativo algal para el tratamiento de agua residual tratada, obtuvieron una remoción de nitratos del 99.7-99.8% en 72 horas. Barsanti y de Gualtieri (2006) mencionan que en todas las algas eucarióticas, el nitrógeno inorgánico está directamente asimilable como amonio, nitrito y nitrato.

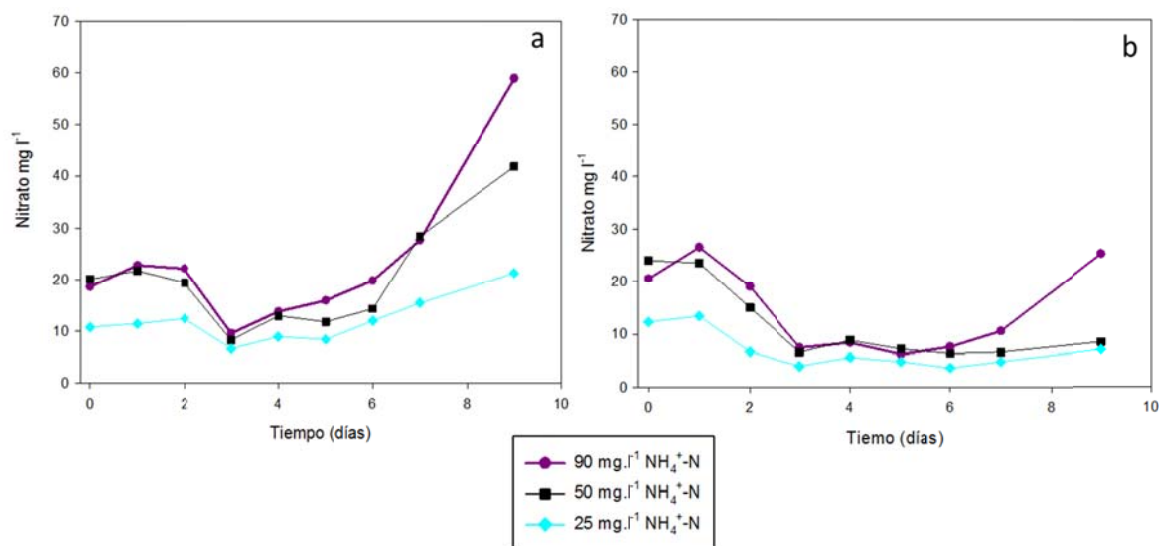


Figura 16. Eliminación de nitrato del agua residual por cultivos de a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.* en concentraciones 90,50, 25 mg.l⁻¹ de N-NH₄⁺.

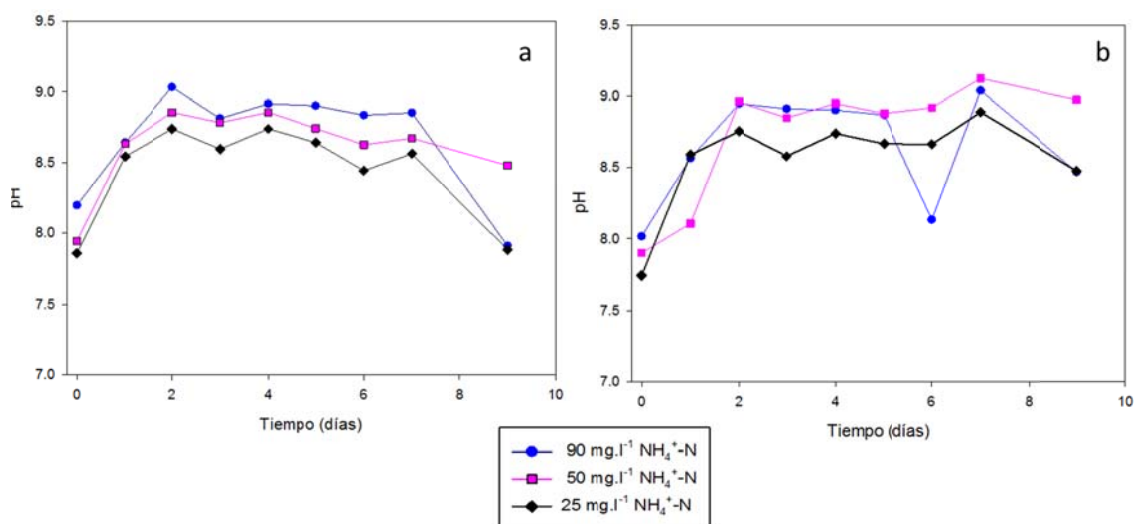


Figura 17. Tendencia del pH durante el cultivo de (a) *Neochloris oleoabundans* y (b) *Chlorella sp.* cultivadas en 90, 50 y 25 mg.l⁻¹ N-NH₄⁺.

Se realizó una correlación entre el pH y el contenido de nitratos, obteniendo una correlación negativa como se muestra en la figura 18. Las microalgas consumen los nitratos liberando HCO₃, el cual produce un aumento de pH; si los nitratos no se consumen por las microalgas el pH disminuye; sin embargo

el pH no siempre comporta como se espera puede ser debido al proceso de nitrificación.

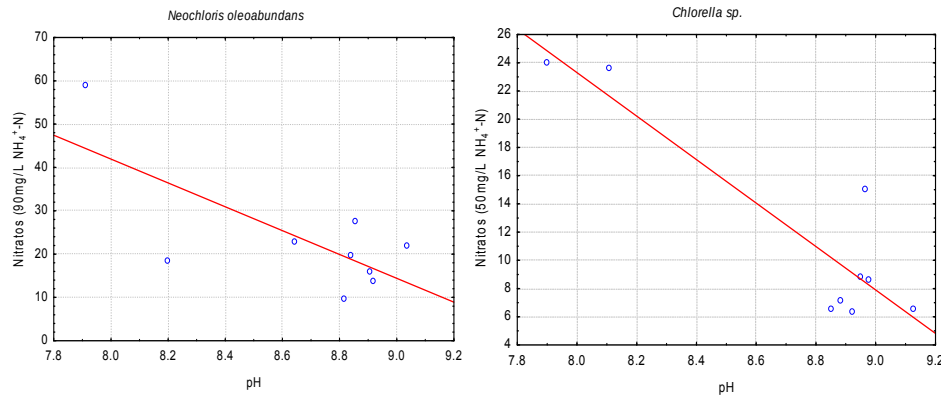


Figura 18. Correlación entre nitrato y pH de *Neochloris oleoabundans*, $r = -0,72$ y *Chlorella sp.*, $r = -0,91$ durante 9 días en diferentes concentraciones de N-NH_4^+ .

4.4.3 Remoción de fósforo

En el cuadro 7 se presentan los resultados obtenidos de remoción de fósforo, en *Neochloris oleoabundans* donde se observa que en concentración de 90 mg.l^{-1} N-NH_4^+ hubo una remoción de 62.6% al cuarto día, sin embargo para los demás días y en las otras dos concentraciones no hubo remoción. El fósforo se mantuvo en concentraciones de 3-7 mg P.l^{-1} en ambas especies. Este fenómeno se debió probablemente a que el pH se mantuvo alcalino después de cultivar las algas en el efluente y causa la precipitación de fosfatos de calcio (Wang *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Contenido de fósforo en el cultivo de las microalgas.

<i>N. oleoabundans</i>				<i>Chlorella sp.</i>		
Tiempo (día)	90 mg·l ⁻¹ N- NH ₄ ⁺⁺	50 mg·l ⁻¹ N- N-NH ₄ ⁺⁺	25 mg·l ⁻¹ N- NH ₄ ⁺⁺	90 mg·l ⁻¹ N-NH ₄ ⁺⁺	50 mg·l ⁻¹ N-NH ₄ ⁺⁺	25 mg·l ⁻¹ N-NH ₄ ⁺⁺
0	4.04 ^{ab}	6.44 ^{ab}	3.63 ^{ab}	3.36 ^a	5.94 ^{abc}	3.01 ^a
1	2.69 ^{cd}	4.53 ^c	2.55 ^c	2.11 ^b	5.48 ^{bc}	3.20 ^a
2	3.34 ^c	5.78 ^{bc}	3.30 ^{bc}	3.17 ^{ab}	6.27 ^{abc}	3.52 ^a
3	3.76 ^{abc}	5.62 ^{bc}	4.06 ^{bc}	3.56 ^a	1.07 ^d	3.55 ^a
4	1.51 ^d	2.03 ^d	1.24 ^d	3.30 ^{ab}	5.42 ^c	3.17 ^a
5	4.05 ^{ab}	5.85 ^b	3.78 ^a	3.73 ^a	6.55 ^{abc}	3.53 ^a
6	4.85 ^a	7.68 ^a	3.38 ^{ab}	3.42 ^a	6.88 ^{ab}	3.21 ^a
7	3.82 ^{abc}	6.28 ^b	2.77 ^{bc}	4.22 ^a	7.03 ^a	3.82 ^a
9	4.17 ^{ab}	5.79 ^{bc}	3.89 ^a	4.39 ^a	9.72 ^a	4.97 ^a

* Diferentes letras en la misma columna son diferentes significativamente $\alpha = 0.05$

4.4.4 Demanda química de oxígeno

Los resultados obtenidos en la remoción de DQO se muestran en el cuadro 8. La remoción de DQO se midió al inicio y final del experimento. Se aprecia que cuando *Neochloris oleoabundans* fue cultivada a 90 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺ la remoción fue de 170 a 3.56 mg DQO l⁻¹, mientras que *Chlorella sp* eliminó de 138.33 a 3.62 mg DQO₂ l⁻¹. Las dos microalgas eliminaron del 97- 98 % de DQO en todos los tratamientos. Éstos resultados coinciden con los obtenidos por Li et al., 2011 quienes mostraron que la concentración de DQO disminuyó de 2390 a 230 mg·l⁻¹ DQO (es decir una 90.3%) en agua residual esterilizada y 2304 a 210 mg·l⁻¹ DQO (90.8%) en agua residual cruda dentro de los dos primeros días de cultivo, ellos sugieren que *Chlorella sp.* utiliza diferentes compuestos orgánicos como fuentes de carbón además de CO₂.

Cuadro 8. Remoción de DQO del efluente de un digestor anaeróbico por cultivos de *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* en varias concentraciones de NH_4^+ .

90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+				50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+		25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+	
		mg l^{-1} DQO	%	mg l^{-1} DQO	%	mg l^{-1} DQO	%
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Inicio	1,700.0		1,450.0		1,450.0	
	Final	35.0	97.9	35.0	97.6	35.0	97.6
<i>Chlorella sp</i>	Inicio	1,383.3		2,450.0		2,700.0	
	Final	35.1	97.5	35.0	98.6	35.2	98.7

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo fueron mayores a los obtenidos por Wang *et al.* (2009) quienes observaron que en agua residual del flujo de un proceso de tratamiento de aguas residuales, *Chlorella sp.* eliminó 50.9, 56.5 y 83.0 % de DQO en los puntos 1, 2, y 4 respectivamente del flujo de tratamiento de aguas residuales.

4.4.5 Crecimiento celular

En la figura 19a se observó el crecimiento celular máximo de *Neochloris oleoabundans* de 1.06×10^6 $\text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al quinto día, en la concentración de 90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ , en los siguientes días descendió el crecimiento. En los tratamientos de 50 y 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ se observó que hasta el sexto día crecieron 1.14×10^6 y 1.03×10^6 $\text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente. La cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* (ver figura 19b) fue de 1.36×10^6 $\text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al quinto día, en la concentración de 90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ . En los tratamiento de 50 y 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ crecieron 1.09×10^6 y 1.63×10^6 $\text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente. Li *et al.* (2010) reportaron que la concentración de biomasa algal fue baja cuando se alimenta con amonio que con nitrato; en este trabajo se observó que el crecimiento celular de ambas

microalgas fue con la absorción de nitrógeno amoniacal. Además el crecimiento celular fue bajo en comparación con Andrade *et al.* (2006) quien obtuvieron una densidad celular en fase estacionaria de $19.24 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ en cultivos de *Chlorella sp.* en efluentes de una laguna facultativa, $13.98 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ en efluente de maduración primaria y $11.14 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ en efluente de maduración secundaria.

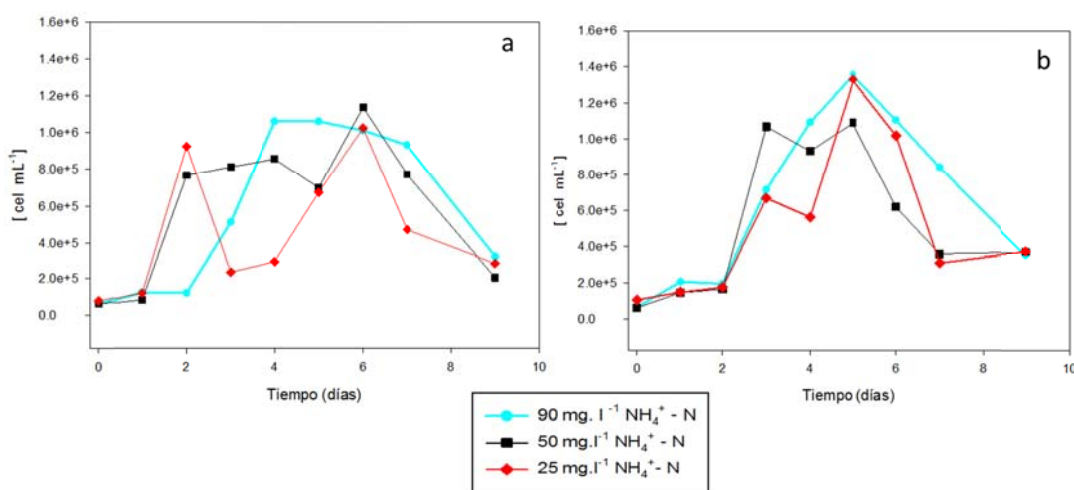


Figura 19 .Curvas de crecimiento a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.* en agua residual del efluente de un digester con diferentes concentraciones de N-NH₄⁺.

En la figura 20a se muestra el contenido de solidos volátiles de biomasa algal de *N. oleoabundans* obtuvo una fluctuación de peso. La producción de biomasa de *Neochloris oleoabundans* fue de 555, 444 y 666 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ en concentraciones de 90, 50 y 25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de nitrógeno amoniacal respectivamente. La mejor productividad de biomasa fue en el tercer día con $188.51 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en la concentración de $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$. En las concentraciones de 50 y 25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ fue 81.48 y $155.55 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectivamente (ver figura 20a). Éstos resultados fueron mejor a los obtenidos por Levine *et al.* (2011), quienes obtuvieron una productividad en biomasa seca de 88.3, 64.0 y $39.9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en

agua residual diluida a 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente. En contraste, Wang y Lan (2011) obtuvieron una productividad de biomasa de $310 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en *N. oleoabundans* cultivada en agua residual sintética que contenía una concentración de $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaNO}_3$. En la figura 21b se muestra la producción de biomasa algal máxima en tres días fue de $444 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a concentraciones de $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de nitrógeno amoniacal, en concentraciones de 50 se obtuvo hasta $777 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; en concentraciones de $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se logró obtener $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Los resultados obtenidos fueron mayores a los obtenidos por Phukan *et al.* (2010) quienes obtuvieron biomasa de $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; Cho *et al.* (2013) reportaron producción de $670 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de biomasa cultivada en agua residual municipal filtrada a $0.2\mu\text{m}$, $410 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en agua residual filtrada a $1.0 \mu\text{m}$ y $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en agua residual puesta en radiación UV. La productividad de biomasa en *Chlorella sp.* en concentración de $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ fue $88.43 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ al séptimo día, mientras que la productividad en concentraciones de 50 y $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ fue 125 y $77 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ respectivamente al tercer día.

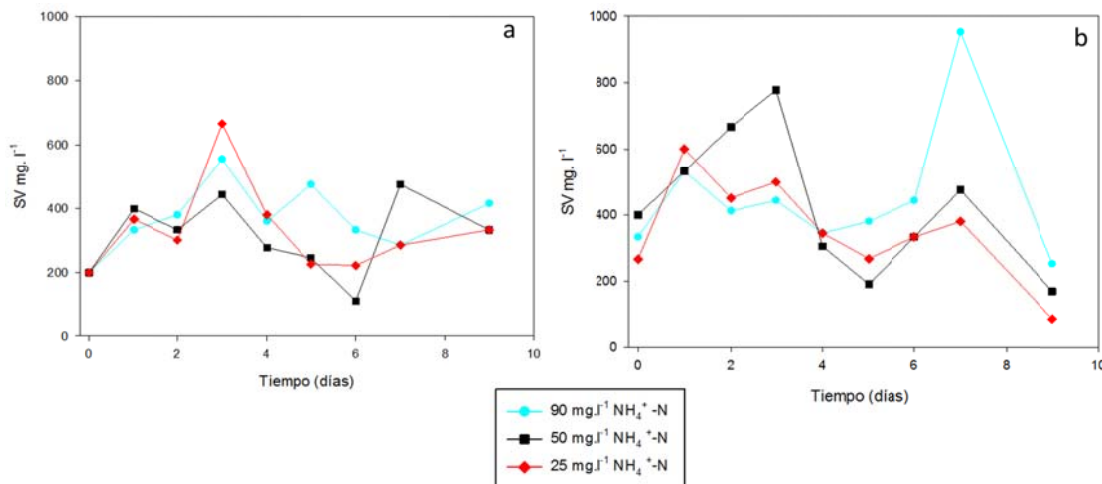


Figura 20. Evolución de los sólidos volátiles de a) *Neochloris oleoabundans* y b) *Chlorella sp.* en agua residual del efluente de un digestor con diferentes concentraciones de N-NH_4^+ .

4.4.6 Contenido de lípidos y ácidos grasos

Los resultados promedio del contenido de lípidos de ambas microalgas al inicio y final del experimento se muestra en el cuadro 9, observando que *N. oleoabundans* obtuvo un 19% de lípidos totales de peso seco en el tratamiento de $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$, es decir la producción de lípidos fue de 8.6 %, en los otros dos tratamientos se notó que *Neochloris oleoabundans* no acumuló lípidos. *Chlorella sp.* obtuvo un 28.3 % de lípidos totales en el tratamiento de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$, la producción fue de 15%, en los otros dos tratamientos se obtuvo una menor producción. Se observó que *Chlorella sp.* produjo más lípidos que *N. oleoabundans* en los tres tratamientos.

Cuadro 9. Porcentaje de lípidos de *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* cultivadas a tres concentraciones de nitrógeno amoniacal.

	Concentración NH ₄ ⁺		
	90	50	25
	% de lípidos totales		
<i>N. oleoabundans</i>			
Inicio	10.4	13.8	30
Final	19.0	13.3	33.3
Producción de lípidos %	8.6	0.5	3.3
<i>Chlorella sp.</i>			
Inicio	9.5	13.3	8.3
Final	19.0	28.3	21.3
Producción de lípidos %	9.5	15.0	13.0

Estos resultados son similares a Zhou et al.(2012), quienes obtuvieron un 28.9% de lípidos totales en la microalga *Auxenochlorella protothecoides* en base a sólidos volátiles suspendidos. Xu et al. (2006) lograron 14.5% de lípidos en condiciones autotróficas de *Chlorella protothecoides*. Woertz et al. (2009)

obtuvieron 9 % y 29% de lípidos en base a peso seco de cultivos mixtos de *Chlorella sp.*, *Micractinium sp.*, *Actinastrum sp.* y *B. braunii* cultivadas en agua residual municipal tratada y en agua residual de desechos lácteos respectivamente. Pruvost *et al.* (2009) extrajeron el 23 % de lípidos totales en base a peso seco de *N. oleoabundans* cultivada en medio bold basal modificado 3N3S. Levine *et al.* (2011) obtuvo una productividad de $3.8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ de lípidos de *Neochloris oleoabundans* cultivada en efluente de desechos lácticos diluida a 1:200.

Los lípidos obtenidos de *Chlorella sp.* fueron analizados por cromatografía de gases, el cromatograma que se muestra en la figura 21 se obtuvo al analizar una muestra del cultivo al tiempo final (9 días). La identificación de algunos ácidos grasos se muestra en el cuadro 10, donde se presenta el % de área total obtenida en el cromatograma para cada uno de los picos presentes. El ácido palmítico se encuentra en un mayor porcentaje del contenido de lípidos extraídos de *Chlorella sp.*

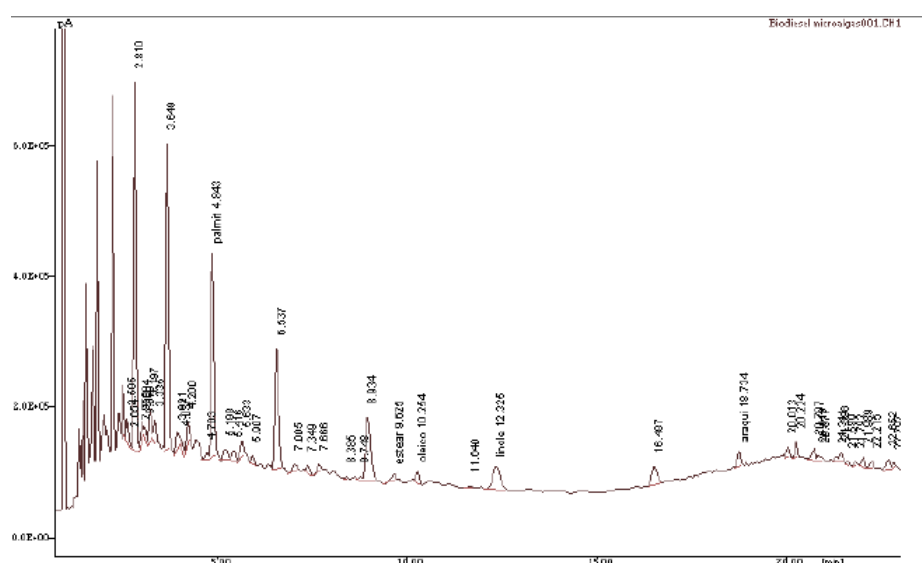


Figura 21. Cromatograma de ácidos grasos obtenidos de la muestra de lípidos totales.

Cuadro 10. Resumen del contenido de lípidos y perfil FAME de las microalgas cultivadas en el efluente.

Tipo de ácido graso	% de área
Ácido palmítico (C16:0)	14.51
Ácido esteárico (C18:0)	0.58
Ácido oleico (C18:1)	0.97
Ácido linoleico (C18:2)	5.30
Ácido araquídico (C20:0)	1.10

El porcentaje de ácidos grasos obtenidos en este trabajo, se encuentran por debajo a los adquiridos por Xu *et al.* (2006) quienes obtuvieron en cultivo de *Chlorella protothecoides* 12.94% de ácido palmítico, 2.76 % de ácido esteárico, 60.84 % de ácido oleico y 17.28% de ácido linoleico. Zhou *et al.* (2012) obtuvo en cultivos de *Auxenochlorella protothecoides* 27.85 % de ácido palmítico, 4.62 % de ácido esteárico y 28.75 % de ácido linoleico. En cultivos de *Chlorella vulgaris* crecida en un efluente de ácidos cítricos produjo un 18.1% de C16:0, 1.3% de C18:0, 3 % de C18:1 y 3.8 % de C18:2 (Li *et al.*, 2012). Popovich *et al.* (2012) mostró un 19.40% de C16:0, 5.75% de C18:0, 46.33% de C18:1, 16.81 % de C18:2 y 0.09% de C20 en cultivos de *N. oleoabundans*.

4.5 Cálculo de la tasa de remoción de nutrientes.

En términos prácticos una ecuación es un modelo que se genera a partir de datos experimentales y expresan la relación de las variables que explican el comportamiento de un sistema real. Talbot *et al.* (1990) realizó un modelo donde relacionó temperatura e intensidad luminosa en microalgas como

Oscillatoriaagardhii, *Ankistrodesmusfalcatus* y *Phormidiumbohneri*. Li et al. (2012); Zhou et al. (2012) aplicaron un modelo exponencial para explicar el crecimiento algal en *Chlorella vulgaris*.

En este estudio se aplicó el método de mínimos cuadrados a la ecuación $X_t = X_0 e^{-kt}$ para determinar la constante de la cinética de remoción k ($\frac{1}{t}$) de nitrógeno amoniacal que se muestra en el cuadro 11 y nitrato cuadro 12. El propósito de realizar esta modelación fue para ajustar los datos experimentales a un modelo de decrecimiento exponencial de remoción de nutrientes. Los datos experimentales de *Neochloris oleoabundans* se ajustaron al modelo de remoción de nutrientes (figura 22 b y c), de igual forma los datos experimentales de *Chlorella sp.* se ajustaron al modelo antes mencionado bajo tres concentraciones diferentes de $N-NH_4^+$ (figura 22 d, e y f).

Cuadro 11. Cálculo de la tasa de eliminación de nitrógeno amoniacal.

		Concentraciones de $N-NH_4^+$ en $mg \cdot l^{-1}$		
Cepa		90	50	25
<i>N. oleoabundans</i>	k	0.27	0.1	0.09
	R ²	0.68	0.88	0.85
<i>Chlorella sp.</i>	k	0.13	0.07	0.06
	R ²	0.79	0.73	0.73

k es constante ($\frac{1}{t}$), R² coeficiente de determinación

Cuadro 12. Cálculo de la tasa de eliminación de nitrato

		Concentraciones de $N-NH_4^+$ en $mg \cdot l^{-1}$		
Cepa		90	50	25
<i>N. oleoabundans</i>	k	0.02	0.09	0.02
	R ²	0.097	0.49	0.052
<i>Chlorella sp.</i>	k	0.18	0.25	0.22
	R ²	0.74	0.88	0.79

k es constante ($\frac{1}{t}$), R² coeficiente de determinación

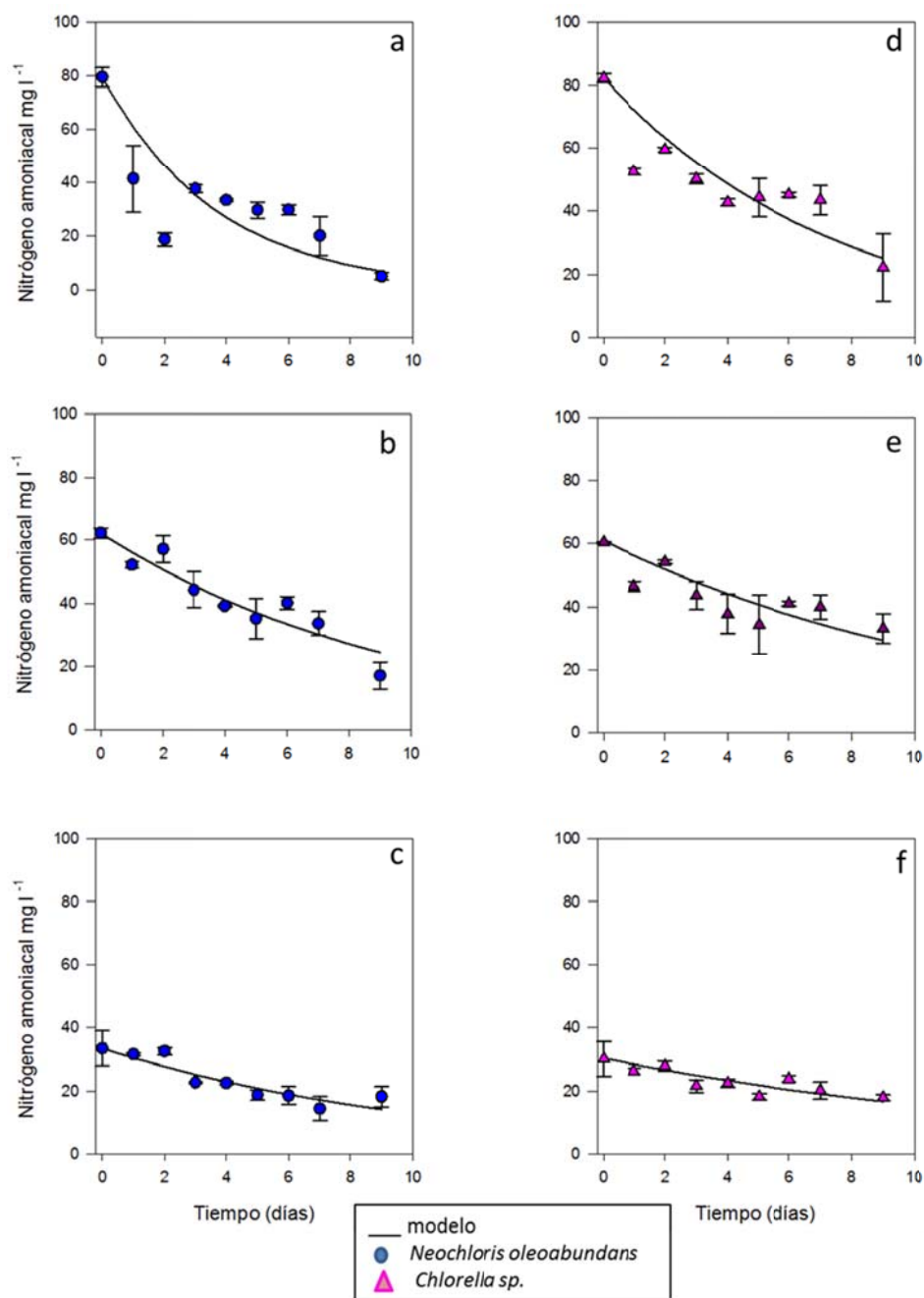


Figura 22. Ajuste de la remoción de nitrógeno amoniacal al modelo en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* en concentraciones de a y d) 90 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺, b y e) 50 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺, c y f) 25 mg·l⁻¹ N-NH₄⁺.

En el caso de la remoción de nitratos, los datos experimentales de *Neochloris oleoabundans* no se ajustaron al modelo de remoción de nutrientes (figura 23 a, b y c), sin embargo, los datos experimentales de *Chlorella sp.* se ajustaron al

modelo antes mencionado bajo tres concentraciones diferentes de N-NH_4^+ (figura 23 d, e y f), observando que mostró un mejor ajuste en concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ (figura 23e).

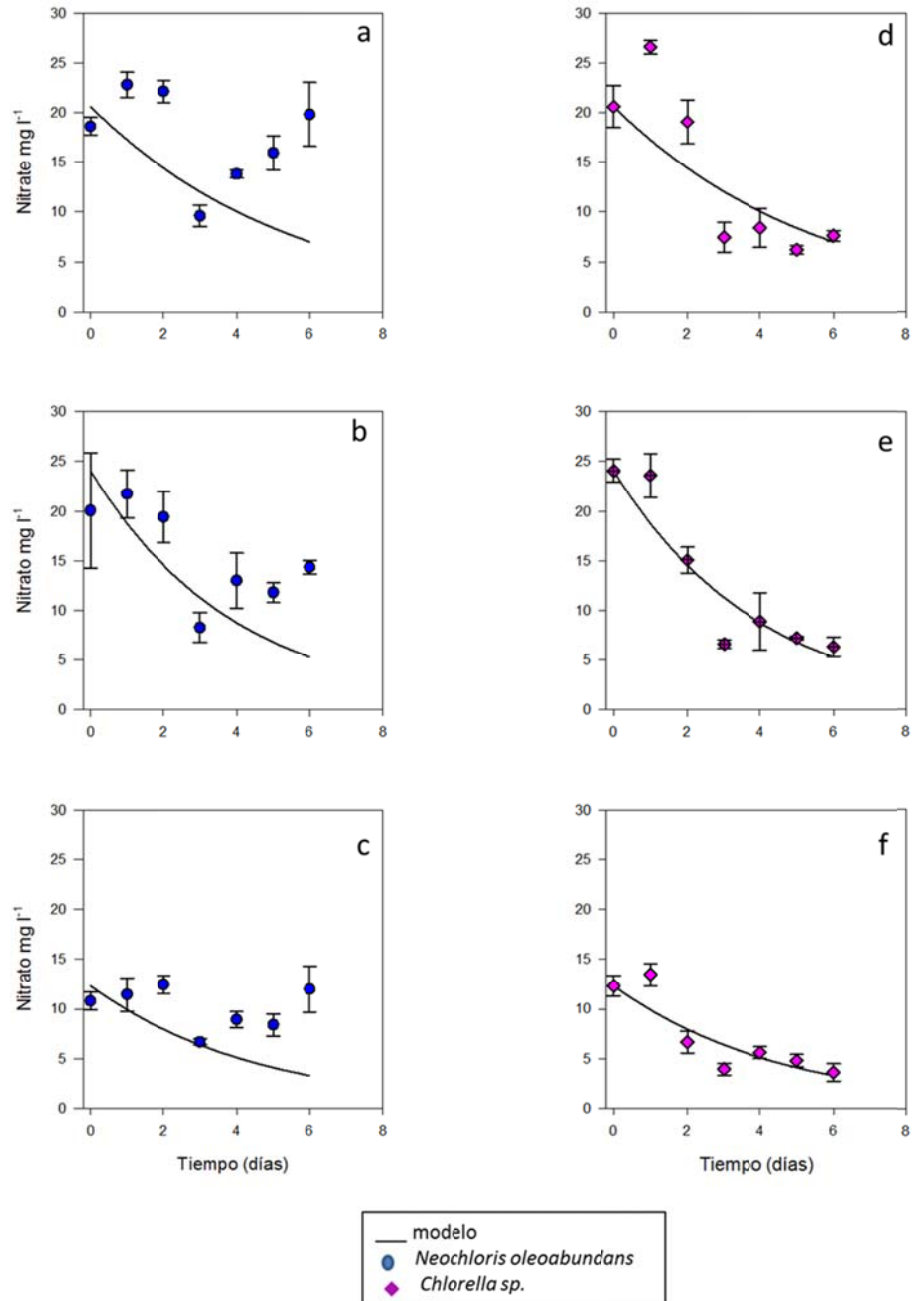


Figura 23. Ajuste de la remoción de nitrato al modelo en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* en concentraciones de a y d) $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ , b y e) $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ , c y f) $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ N-NH_4^+ .

CAPÍTULO

5

5 CONCLUSIONES

Derivado del presente trabajo se obtienen las siguientes conclusiones:

1.- Las microalgas *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* crecieron en el efluente de un digestor anaeróbico, donde *N. oleoabundans* removió hasta un 94 % de N-NH_4^+ en concentraciones de $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de nitrógeno amoniacal, en concentraciones inferiores la remoción fue menor al 80%. *Chlorella sp.* removió el 73% de N-NH_4^+ en concentraciones de $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de nitrógeno amoniacal, a concentraciones bajas solo elimina menos del 50%. La remoción de fósforo fue del 100% en ambas especies al tercer y séptimo día en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.* respectivamente. La eliminación de DQO en ambas especies fue mayor del 95%.

2.- Las microalgas *Neochloris oleoabundans* y *Chlorella sp.* fueron capaces de eliminar los nutrientes de las aguas residuales en presencia de materia orgánica. En este efluente se logró cultivar ambas especies principalmente *Neochloris oleoabundans* que es una especie que se ha cultivado poco en agua residual y pueden utilizarse para proporcionar tratamiento terciario a efluentes del digestor anaeróbico aunado a la producción de biomasa algal que genere ácidos grasos.

3.- La producción de biomasa algal máxima en tres días en *Chlorella sp.* fue de 444 mg·l⁻¹ a concentraciones de 90 mg·l⁻¹ de nitrógeno amoniacal, en concentraciones de 50 se obtuvo 777 mg·l⁻¹; en concentraciones de 25 mg·l⁻¹ fue de 500 mg·l⁻¹. La biomasa de *Neochloris oleoabundans* se obtuvo 555, 444 y 666 mg·l⁻¹ en concentraciones de 90, 50 y 25 mg·l⁻¹ de nitrógeno amoniacal respectivamente.

4.- El porcentaje de lípidos totales acumulados en *N. oleoabundans* fue del 19 % en concentración de 90 mg·l⁻¹ de nitrógeno amoniacal. *Chlorella sp.* obtuvo el 28.3 % de lípidos totales en concentración de 50 mg·l⁻¹ de nitrógeno amoniacal. La productividad de lípidos fue del 8.6% y 15 % en *N. oleoabundans* y *Chlorella sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Rodríguez–Monroy J. y Durán de Bazúa C. (2006) Remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de aguas residuales usando humedales artificiales de flujo vertical a escala de banco. *Tecnol. Ciencia Ed.* 21, 25–33.
- 2.-Silk, N. and K. Ciruna, (2004) A practitioner's guide to freshwater biodiversity conservation Island Press. Washington, DC, USA.
- 3.- CNA (2011) Estadísticas del Agua en México.
- 4.- SEMARNAT (2011) Situación del Subsector de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento.
- 5.- Crittenden John C., Rhodus Trussell R., Hand David W., Howe Keny J. y Tchobanoglous George. (2005) *Water Treatment principles and desing*. Second Edition. Edit John Wiley Sons, Inc. USA. Cap 19.
- 6.- Crites, R. y Tchobanoglous, G. (2000) *Sistemas de manejo de aguas residuales para núcleos pequeños y descentralizados*. McGraw-Hill Interamericana, Santa Fe de Bogotá (Colombia).
- 7.- Cortés, M., J. E. (1993) *Plantas de Tratamiento de Aguas residuales Para Pequeñas Comunidades*, Disponible en <http://wikibooks.org/wiki/ingenier>
- 8.-MEA (2005) *Ecosystems and human well-being, Current state and trends*, vol.I Millennium ecosystems assessment. USA 2005.
- 9.- UNEP. GEO 4 (2007) *Global Environmental Outlook.Environment for development*.United Nations Environment Programme. Malta

- 10.- Esponda A. (2001) Arranque de un sistema experimental de flujo vertical a escala piloto de tipo humedal artificial para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- 11.- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. (2008) CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 79(5):707-718.
- 12.- Cho Sunja, Luong Thanh Thao, Lee Dukhaeng, Oh You- Kwan and Lee Taeho. (2011) Reuse of effluent water from a municipal wastewater plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 8639-8645.
- 13.-Yetilmezsoy K., Sakar S. (2008) Improvement of COD and color removal from UASB treated poultry manure wastewater using Fenton's oxidation. *Journal of Hazardous materials*; 151:547–58.
- 14.-Yetilmezsoy K, Sapci-Zengin Z. (2009) Recovery of ammonium nitrogen from the effluent of UASB treating poultry manure wastewater by MAP precipitation as a slow release fertilizer. *Journal of Hazardous materials*;166:260–9.
- 15.-Montusiewicz A, Lebiocka M, Rozej A, Zacharska E, Pawlowski L.(2010) Freezing thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. *Bioresource Technology*;101:3466–73.
- 16.- El-Mashad HM and Zhang RH. (2007) Co-digestion of food waste and dairy manure for biogas production. *Transactions of the ASABE* 50:1815–22.

- 17.-Garibay Hernández Adriana, Vazquez-Duhalt Rafael, Sanchez Saavedra M. del Pilar, Serrano Carreón Leobardo y Martínez Jiménez Alfredo.(2009) Biodiesel a partir de Microalgas. Bio Tencnología Vol. 3 No.3
- 18.- Arredondo B. O y Vázquez-Duhalt R. (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. Ciencia y Desarrollo. 17: 99-111.
- 19.- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, &Roessler P (1998) A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p. www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf
- 20.- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M y Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. Plant J. 54:621-639.
- 21.- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294-306.
- 22.- Gatenby CM, Orcutt DM, Kreeger DA, Parker BC, Jones VA & Neves RJ (2003) Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. J. Appl. Phycol. 15:1-11.
- 23.- Ben-Amotz A, Tornabene TG & Thomas WH(1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 21: 72-81.
- 24.-Metzger P & Largeau C. (2005) Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids.Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 486-496.

- 25.- Cohen Z. (1986) Products from microalgae. In: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A (ed.) CRC Press pp. 421-454.
- 26.- Gouveia L. y Oliveira AC. (2009) Microalgae as raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 269-274.
- 27.-Li Q, Du W & Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 749-756.
- 28.- Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo. (2006) Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Taylor& Francis group.301 páginas.
- 29.- Brennan, L. y Owen, P. (2010) Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. Renew Sus. Energy Rev. 14, 557-577
- 30.-Stephens, E., Ross, I. L., King Z., Mussnug, J.H., Kruse O., Posten C., Borowitzka M.A., Hankamer, B. (2010) An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. Nat. Biotechnol. 28, 126-128
- 31.- Hu Q, Guterman H, Richmond A (1996) A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. Biotechnol. Bioeng. 51: 51-60
- 32.- Hu Q, Kurano N, Kawachi M, Iwasaki I, Miyachi S (1998) Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 655-662.
- 33.- Richmond, A. (1986) Microalga culture: Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 4 Boca Raton, CRC Press, 369-438

- 34.- Avron, M. y Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton.
- 35.- Vílchez C, Garbayo I, Lobato MV, Vega J. (1997) Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology* 20: 562-572.
- 36.- Wuhrmann, K., Woker, H. (1948) Beiträge zur Toxikologie der Fische. II. Experimentelle Untersuchungen über die Ammoniak- und Blausäure vergiftung. *Schweiz. Z. Hydrol.* 11, 210–244.
- 37.- Downing, K.M., Merkens, J.C. (1955) The influence of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of un-ionised ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Ann. Appl. Biol.* 43, 243–246.
- 38.- Ramos, J. L., Guerrero, M. G., and Losada, M. (1987) Factors affecting the photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the cyanobacterium *Anabaena*. *Biotechnol. Bioeng.* 29,566-571
- 39.- Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L & Betenbaugh MJ (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:430-436.
- 40.- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O & Hankamer B (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- 41.- Meng X, Yang X, Xu X, Zhang L, Nie Q & Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 34: 1-5.

- 42.-Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol* 99(11): 4717-4722
- 43.-Xiong, W., Li, Xiang, J., Wu, Q. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (1):29-36
- 44.- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, T. (2000) Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB 1999. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(1):112-117.
- 45.-Li, Y. y Qin, J.G. (2005) Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *J Appl Phycol* 17 (6):551-556
- 46.- Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102(1):100-112.
- 47.-Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269-274.
- 48.- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci Bioeng* 101 (2): 87-96
- 49.- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 20(3):245-251.

- 50.- Gouveia, L., Marques, A. E., Lopes da Silva, T., Reis, A. (2009) *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. J Ind Microbiol Biotechnol 36:821-826
- 51.- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju Y.H. (2009) Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. J Taiwan Inst Chem E 40(1):13-20.
- 52.- Mendoza, H., Molina Cedres, C., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K., Carmona, L.(2008) Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. Grasas Aceites 59(1):27-32.
- 53.- Mandal, S., Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production .Appl Microbiol Biotechnol 84(2):281-291.
- 54.- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q.(2008c) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. Appl Microbiol Biotechnol 81(4):629-636.
- 55- Francisco, E.C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T. (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. J ChemTechnolBiotechnol 85: 395-403.
- 56.- Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Tsai. M.-T., Ong, S.-C., Chen, C.-H., Lin, C.-S. (2009) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. Bioresource Technol 100(2):833-838

- 57.-Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T. (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliellacells*. *J BiosciBioeng*101(3):223-226.
- 58.- Mazzuca-Sobczuka, T., Chisti, Y. (2010) Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J ChemTechnolBiotechnol*85:100-108.
- 59.- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049.
- 60.-Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., Tanaka, T. (2009) Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward.
- 61.- De, B.K., Chaudhury, S., Bhattacharyya, D.K. (1999) Effect of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *JAACS* 76(1):156.
- 62.- Illman Am, Scragg Ah, Shales SW. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol.* 27(8):631-635.
- 63.- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z. (2002) Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60, 497–503
- 64.- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S. and Burris, N. (1983) Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5, 435–440.

- 65.- Jin HF, Lim BR, Lee K. (2006) Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 41: 2813-2824.
- 66.- Feng P, Deng Z, Hu Z, Fan L. (2011) Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology* 102: 10577-10584
- 67.- Ho S-H, Chen C-Y, Lee D-J, Chang J-S. (2011) Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems — A review. *Biotechnology Advances* 29: 189-198.
- 68.- Parker, P.L., van Baalen, C. and Maurer, L. (1967) Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. *Science*, 155, 707–708.
- 69.- Orcutt, D.M. and Patterson, G.W. (1975) Sterol, fatty acid and elemental composition of diatoms grown in chemically defined media. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B, 579–583.
- 70.- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. and Parry, D.L. (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195–214.
- 71.- Sukenik, A. (1999) Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In *Chemicals from Microalgae* (Cohen, Z., ed.). London: Taylor & Francis, pp. 41–56.
- 72.-Cohen, Z. (1999) *Monodus subterraneus*. In *Chemicals From Microalgae* (Cohen, Z., ed.). London: Taylor & Francis, pp. 25–40.

- 73.- Volkman, J.K., Smith, D.J., Eglinton, G., Forsberg, T.E.V. and Corner, E.D.S. (1981) Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 61, 509–527.
- 74.- Kawachi, M., Inouye, I., Honda, D., O'Kelly, C.J., Bailey, J.C., Bidigare, R.R. and Andersen, R.A. (2002) The pinguiphyceae classis nova, a new class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids. Phycol.Res. 50, 31–47.
- 75.- Mansour, M.P., Volkman, J.K., Jackson, A.E. and Blackburn, S.I.(1999) The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. J. Phycol. 35, 710–720.
- 76.- Fischer CR, Klein-Marcuschamer D & Stephanopoulos G (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. Metab. Eng. 10: 295-304.
- 77.- Beer LL, Boyd ES, Peters JW & Posewitz MC (2009) Engineering microalgae for biohydrogen and biofuel production. Curr. Opin. Biotechnol. 20: 264-271.
- 78.- Metzger P & Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*, a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 486-496.
- 79.- Guschina, I.A. and Harwood, J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog. Lipid Res. 45, 160–186.
- 80.- Knothe, G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Processing Technol. 86, 1059–1070.
- 81.- Robert Anderson (2005) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. EUA.

- 82.- Fenton O. y Ó hUallacháin D. (2012) Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. *Algal Research* (1) 49-56.
- 83.- Sriram S. and Seenivasan R. (2012) Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (2): 9-13. *Phycospectrum* ISSN:2229-6905
- 84.- Huntley ME y Redalje DG (2007). CO₂mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*.12: 573- 608.
- 85.- Oilgae (2009). Oilgae digest. The algae energy Industry. www.oilgae.com
- 86.- Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102: 17-25.
- 87.- Hyenstrand P, Burkert U, Pettersson A, Blomqvist P. (2000) Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply. *Hydrobiologia* 435: 91-98.
- 88.- Vílchez C, Garbayo I, Lobato MV, Vega J. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology* 20: 562-572.
- 89.- Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 5494-5500.

- 90.- Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC. (2011) Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy* 88: 3425-3431.
- 91.- Lau P.S., Tam N.F.Y., Wong Y.S. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ Pollut* 89, 59-66.
- 92.- Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa LG, Stephenson T. (2010) Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101: 58-64.
- 93.- Shi J., Podola B., Melkonian M. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *J. Appl. Phycol* 19, 417-423.
- 94.- Wang L, Li Y, Chen P, Min M, Chen Y, Zhu J, Ruan RR. 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* 101: 2623-2628.
- 95.- Martínez M., Sánchez S., Jiménez J., Yousfi F., Muñoz L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresourc Thechol* 73:263-72
- 96.- Zhang E, Wang B, Wang Q, Zhang S, Zhao B. 2008. Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology* 99: 3787-37
- 97.- Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical

Assessment. Pages 77-136 in Donald LS, ed. *Advances in Agronomy*, vol. Volume 108 Academic Press.

98.- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*15(4): 377-390.

99.- Chinnasamy, S., Bhatnagar A., Claxton R. and Das K.C. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol.* 101: 30907-3105.

100.- Aslan S, Kapdan IK. (2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28: 64-70.

101.- Lee AK, Lewis DM & Ashman P (2009) Microbial flocculation, a potentially low cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Phycol.* 21: 559-567.

102.- Abou-Shanab Reda A.I., Ji Min-Kyu, Kim Hyun-Chul, Paeng Ki-Jung, Jeon Byong-Hun. 2013. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of Environmental Management* 115: 257-264

103.- Wilkie AC, Mulbry WW. (2002) Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresource Technology* 84: 81-91.

104.- An, J.Y., Sim, S.J., Kim B.W. (2003) Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii* *J. Appl. Phycol*, 15, 185-191

105.- González-Fernández C, Molinuevo-Salces B, García-González MC. 2011. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of

microalgae–bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource Technology* 102: 960-966.

106.- Levine RB, Costanza-Robinson MS, Spatafora GA. (2011) *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy* 35: 40-49.

107.- Wang B, Lan CQ.(2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology* 102: 5639-5644.

108.- Popovich CA, Damiani C, Constenla D, Martínez AM, Freije H, Giovanardi M, Pancaldi S, Leonardi PI. (2012) *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource Technology* 114: 287-293.

109.- Griffiths MJ & Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.

110.- Band Schmidt Christine Johanna. 1991. Tesis: Cinética del cambio fisiológico en *Neochloris oleoabundans*, (Chlorococcaceae, Chlorophyceae), sometida a un choque osmótico salino. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

111.- Lewin, Ralph A. (1962). *Physiology and Biochemistry of algae*. Academic Press. 929 páginas.

112.- Lee R. E. (1995) *Phycology*. Cambridge, University Press, USA.

- 113.- Stephanie Lansing, Joaquin Viquez y Helen Martinez. (2007) Evaluation digester for electricy generation. Revista Biocycle International.
- 114.- Estrada Alvares Julián, Gómez Londoño Germán y Jaramillo Jiménez Alberto (2008) Efecto del biodigestor plástico de flujo continuo en el tratamiento de aguas residuales de establos de bovinos. Vet. Zootec. 2 (2):9-20, 2008.
- 115.- Chen R, Li R, Deitz L, Liu Y, Stevenson RJ, Liao W. 2012. Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. Biomass and Bioenergy 39: 128-138.
- 116.- AQL (Aqualimpia, SV). 2004. Descontaminación de riles de granjas porcinas (Purines,en línea). San Salvador, SV. Consultado 11 set. 2006. Disponible en <http://www.aqualimpia.com/Purines.htm>
- 117.- Hach. (2004). Hach water analysis handbook.4th ed., Colorado, USA.
- 118.- APHA (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 20th Edition. American Public Health Association, Washington DC.
- 119.- Clement, B., Merlin, G., (1995) The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed. Sci. Total Environ. 170, 71–79.
- 120.-Zhang Yalei, Su Hongyang, Zhong Yunna, Zhang Chunmin, Shen Zheng, Sang Wenjing, Yan Gang, Zhou Xuefei. (2012). The effect ofbacterial contamination on the heterotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa in wastewater from the production of soybean products Water research 46: 5509-5516
- 121.-Garibay Hernández Adriana, Morales Sánchez Daniela y León Saiki Graciela Mitsue. (2012) Manual de prácticas del curso Principios y aplicaiones de biotecnología microalgal,

- 122.- Feng Pingzhong, Deng Zhongyang, Fan Lu and Hu Zhengyu. (2012) Lipid acumulation and growth characteristic of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol 14 No. 4 405-410.
- 123.- Vázquez-Duhalt R. y Greppin H. (1987) Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*, *Phytochem* 26:885-889
- 124.-Band CJ., Arredondo Vega BO., Vázquez-Duhalt R. y Greppin H. (1992) Effect of a salt osmotic upshock on the edaphic microalga *Neochloris oleoabundans*. *Plant Cell Enviroment* 15: 129-133
- 125.- FEUM (2008). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Manteca de cacao, composición de ácidos grasos. Novena edición. Vol I.
- 126.- Bertoldi Fabiano Cleber, Anna Ernani Sant' y Oliveira Jorge Luiz Barcelos (2008) Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.1, p.54-58, ISSN 0103-8478
- 127.- Rodas-Gaitán, Heberto A.; Rodríguez- Fuentes, Humberto; Flores-Mendiola, Gerardo; Vidales-Contreras, Juan A.; Aranda-Ruiz, Juana; Luna-Maldonado, Alejandro I.(2012) Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 35, núm. 5 pp. 83-86, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.Chapingo, México
- 128.- Li Yecong, Chen Yi-Feng, Chen Paul, Min Min, Zhou Wenguang, Martinez Blanca, Zhu Jun and Ruan Roger.(2011) Characterization of microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for

nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 102 5138-5144.

129.- Li, X., Hu, H.-y., Gan, K., Yang, J., 2010. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecol. Eng.* 36, 379–381.

130.- Andrade Charity, Chacón Carmen, Cárdenas Carmen y Morales Avendaño Ever(2006). Remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales urbanas por la microalga *Chlorella* sp. en condiciones de laboratorio. *CIENCIA* 14(1) 56-63. Maracaibo, Venezuela.

131.- Wang L, Li Y, Chen P, Min M, Chen Y, Zhu J, Ruan RR. (2010) Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* 101: 2623-2628.

132.- Su Y, Mennerich A, Urban B. (2012) Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology* 124: 157-162.

133.- Li Changling YH, Xia Xiaole, Li Yuji, Chen Luping, Zhang Meng, Zhang Ling. (2012) High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. *Bioresource Technology* 127: 248-255.

134.- Li, X., Hu, H.-y., Gan, K., Yang, J., (2010) Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecol. Eng.* 36, 379–381.

135.- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45 (1), 11–36.

- 136.- Oswald, W. J. (1988) Microalgal Biotechnology (Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J., Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 305-328
- 137.- Goldman, J. C., Y Azotea, C.B. Riley y M.R. Dennett (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures and biomass regulation. J Exp. Mar. Biol. Ecol 1-13 57
- 138.- Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo. (2006) Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology Taylor & Francis group.301 páginas.
- 139.- Phukan Mayur M CRS, Konwar B.K., Kataki R. (2010) Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock. Applied Energy.
- 140.- Cho S, Lee N, Park S, Yu J, Luong TT, Oh Y-K, Lee T. (2013) Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. Bioresource Technology 131: 515-520.
- 141.- Zhou Wenguang HB, Li Yecong, Min Min, Mohr Michael, Du Zhenyi, Chen Paul, Ruan Roger. (2012) Mass Cultivation of Microalgae on Animal Wastewater: a Sequential Two-Stage Cultivation Process fo Energy Crop and Omega-3-Rich Animal Feed Production. Appl Biochem Biotechnol: 348-363.
- 142.- Pruvost J, Van Vooren G, Cogne G, Legrand J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor. Bioresource Technology 100: 5988-5995.
- 143.- Woertz, I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y. (2009). Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock J Environ Eng 135:1115-22