



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ENERGÍA – ENERGÍA Y MEDIOAMBIENTE

ESTUDIO DE LA MICROALGA *VERRUCODESMUS VERRUCOSUS* COMO FUENTE
POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS CON FINES BIOENERGÉTICOS Y DE
BIOREMEDIACIÓN AMBIENTAL.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
EMILIO ARENAS GUERRERO

TUTOR: DR. SEBASTIAN PATHIYAMATTON JOSEPH IER-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ALINA JUANTORENA UGAS
DR. SERGIO ALBERTO GAMBOA SANCHEZ
DR. ALBERTO ALVAREZ GALLEGOS
DR. SERGIO SALDAÑA TRINIDAD

UAEM
IER-UNAM
CIICAP UAEM
UP CHIAPAS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. ALBERTO ÁLVAREZ GALLEGOS
Secretario: DR. SERGIO ALBERTO GAMBOA SÁNCHEZ
Vocal: DR. JOSEPH SEBASTIAN PATHIYAMATTON
1 er. Suplente: DR. SERGIO SALDAÑA TRINIDAD
2 d o. Suplente: DRA. ALINA JUANTORENA UGAS

Lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Ficología Aplicada, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Iztapalapa (UAM-I), Ciudad de México, México

Laboratorio de Bioenergía, Instituto de Energías Renovables (IER-UNAM), Temixco,
Morelos, México

TUTOR DE TESIS:

DR. JOSEPH SEBASTIAN PATHIYAMATTON

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), del Espacio Común de Educación Superior (ECOES), del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) y del proyecto PAPIIT IN106516 por ser parte fundamental para la realización de esta investigación.

Al Instituto de Energías Renovables (IER-UNAM), mi segunda casa, por todo lo que me dio de manera personal y profesional, en especial gracias al Director Antonio del Río por su valioso apoyo e interés en este proyecto.

A mi tutor, Dr. Sebastian Joseph, por todo lo que construimos en más de cuatro años, por su paciencia, apoyo y confianza para con este proyecto.

A mi primera luz en este camino, Dra. Alina Juantorena, por marcar la senda que teníamos que recorrer, por siempre aterrizarme al mundo real, por todos sus consejos y amistad.

A mi segunda luz, Mtra. Mónica Rodríguez, por abrirme las puertas del laboratorio de Fisiología Aplicada, por enseñarme tanto, por las aportaciones tan valiosas hasta el final de este escrito y por su linda amistad. Gracias también a su equipo de trabajo, en especial a Lili por ser otra gran maestra y amiga.

A todo el equipo de Hidrógeno y Bioenergía, por todos esos seminarios que sirvieron para pulir todos nuestros trabajos.

Al resto de mi comité, Dr. Alberto Gallegos, Dr. Sergio Gamboa y Dr. Sergio Saldaña. Gracias por sus valiosos consejos durante estos años, sus aportaciones y sugerencias para con este trabajo.

A los alumnos y equipo de laboratorio, gracias Migue, Dany, Emmanuel, Héctor, Laura y todos lo que llegaron y se fueron. Sin ellos todo sería monótono y más complicado.

A la Dra. Adriana por tomarse el tiempo de leer y corregir a detalle esta tesis.

Al Dr. Ismael León y Técnico María Gregoria del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ-UAEM), por la cromatografía de gases-masas y por todo su tiempo.

Por las espectaculares imágenes de barrido electrónico, agradezco al Fis. José Campos por toda su paciencia y buen humor.

A la Mtra. Paty Altuzar, por los cientos de muestras que se analizaron en FTIR, gracias por todo su tiempo y las buenas charlas entre experimentos.

DEDICATORIA

“No creas nada por el simple hecho de que muchos lo creen o finjan que lo creen; créelo después de someterlo al dictamen de la razón y a la voz de la conciencia”

सिद्धार्थ गौतम

Este logro es de todos,

*Al origen de todo esto, mis padres, por estar siempre presentes, por su amor y apoyo incondicional
Gracias grandes guías, padres y amigos por dar tanto*

*A Egna, mi compañera de viaje, por todo el amor y trabajo en equipo, por su presencia, comprensión y
días felices*

*A mis hermanas. Ana y Chío, por apoyar en todo momento este proyecto, por ser parte de él, así como
de mi vida, las admiro mucho*

A Egna, par de Victor's, Zyan y Zazyl, por todo su apoyo y ánimo durante esta investigación

A mis cuñados Kurt y Kimo por evidenciar y ser parte de este gran camino

*A mis grandes amigos y colegas, a quien también dedico este logro. Oscar, Pinky, César, Benjamín,
Mony, Susy, Juan, Paola, Caro, Pedro, Arlette, Dany Balboa, Hernán, Oli, Ceja, Omar, Victor, Rosell, Ing.
Pollo, Federico, Mario, Diamantito, Trigo, Raúl, Andrea, Mara, Victor, Gabriel, Pilo, Bere, Mel, Ro, Pepe y
Rafa*

*Y a los sobrinos más queridos, porque son la motivación para hacer un mundo mejor
Zoe, Rigel, Nico y Tessa. Gracias Pao por el apoyo en esta investigación*

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Composición química de algunos productos de consumo humano y diferentes especies de microalgas (% en peso seco).	8
Tabla 2. Comparación de la tasa de fijación de CO ₂ , concentración, rendimiento de biomasa y producción de lípidos para algunas especies de microalga.	10
Tabla 3. Productos de alto valor derivados de microalgas y fuentes alternativas.	12
Tabla 4. Taxonomía de la especie <i>Verrucodesmus verrucosus</i> .	13
Tabla 5. Parámetros más utilizados que afectan la producción de lípidos.	18
Tabla 6. Estrategias novedosas que afectan la producción de lípidos.	19
Tabla 7. Contenido de lípidos de algunas microalgas y cianobacterias.	23
Tabla 8. Principales ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo.	32
Tabla 9. Productividad de biomasa algal en diferentes sistemas de cultivo (abiertos y cerrados).	37
Tabla 10. Eficiencia de recuperación de biomasa para distintos métodos de cosecha y especies de microalga.	43
Tabla 11. Rendimiento de extracción lipídica y eficiencias de algunos métodos de extracción para diferentes especies de microalga.	48
Tabla 12. Ácidos grasos más comunes.	49
Tabla 13. Perfil de ácidos grasos para distintas especies de microalgas.	50
Tabla 14. Principales bandas de absorción de microalgas en el infrarrojo.	67
Tabla 15. Concentraciones de referencia para generar la curva estándar (Análisis de Amonio).	70
Tabla 16. Composición para 10 mL de la mezcla de reactivos (Análisis de Ortofosfatos).	71
Tabla 17. Concentraciones de referencia para generar la curva estándar (Análisis de Ortofosfatos).	72
Tabla 18. Valores de crecimiento. Tasa de crecimiento específico μ , Divisiones por día (k) y tiempo de duplicación (150 mL).	75
Tabla 19. Valores de crecimiento. Tasa de crecimiento específico μ , Divisiones por día (k) y tiempo de duplicación (10 y 16 L).	78
Tabla 20. Rendimiento de producción de biomasa de la especie <i>Verrucodesmus verrucosus</i> en diferentes medios de cultivo.	81
Tabla 21. Comparativa con otros estudios para los rendimientos de producción de biomasa para algunas especies de la familia Scenedesmaceae.	82
Tabla 22. Eficiencia de remoción de nutrientes para algunas especies de la familia Scenedesmaceae.	87
Tabla 23. Comparativa en el contenido de lípidos para algunas especies de la familia Scenedesmaceae.	89
Tabla 24. Rendimiento de extracción de aceite para la <i>V. verrucosus</i> en diferentes medios de cultivo.	93
Tabla 25. Rendimientos de extracción de lípidos vía Soxhlet comparados entre algunas especies de la familia Scenedesmaceae.	94
Tabla 26. Perfil de ácidos grasos para la especie <i>V. verrucosus</i> en diferentes medios de cultivo.	95
Tabla 27. Perfil de ácidos grasos para algunas especies de la familia Scenedesmaceae en diferentes medios de cultivo.	96

Lista de Figuras

	Página
<i>Figura 1. Especies de microalgas comercialmente utilizadas.</i>	3
<i>Figura 2. Proceso general de la fotosíntesis.</i>	4
<i>Figura 3. Reacción de Fosforilación.</i>	4
<i>Figura 4. Asimilación de carbono y productos de la fase oscura.</i>	5
<i>Figura 5. Ciclo de Calvin-Benson.</i>	6
<i>Figura 6. Productos derivados de la biomasa algal.</i>	7
<i>Figura 7. Sistema de microalgas para la captura de emisiones de CO₂ provenientes de una planta carboeléctrica.</i>	9
<i>Figura 8. Sistema cerrado para el tratamiento de aguas residuales municipales a partir de microalgas.</i>	11
<i>Figura 9. Verrucodesmus verrucosus bajo microscopio de luz.</i>	14
<i>Figura 10. Crecimiento celular y producción de lípidos en diferentes fases de crecimiento microalgal.</i>	14
<i>Figura 11. Ruta metabólica microalgal para la producción de Triglicéridos (TAGs).</i>	16
<i>Figura 12. Biosíntesis de lípidos microalgales.</i>	17
<i>Figura 13. Composición de la biomasa algal y algunas aplicaciones.</i>	21
<i>Figura 14. Sistemas de cultivo microalgal.</i>	27
<i>Figura 15. Sistemas abiertos para el cultivo algal.</i>	29
<i>Figura 16. Sistemas cerrados para el cultivo algal.</i>	31
<i>Figura 17. Planta Industrial Arcos, España. Diseño de Fotobioreactores tubulares horizontales.</i>	33
<i>Figura 18. Fotobioreactores planos en el sur de Portugal.</i>	34
<i>Figura 19. Fotobioreactores de columna en Alicante, España.</i>	35
<i>Figura 20. Fotobioreactor tipo tanque agitado.</i>	36
<i>Figura 21. Combinación de sistemas abiertos y cerrados en un mismo proceso.</i>	36
<i>Figura 22. Métodos de cosecha algal.</i>	38
<i>Figura 23. Centrifugación de biomasa algal.</i>	39
<i>Figura 24. Proceso de floculación algal.</i>	40
<i>Figura 25. Diagrama de un sistema combinado de floculación con un sistema DAF para la cosecha microalgal.</i>	41
<i>Figura 26. Proceso de electrofloculación para la cosecha microalgal</i>	42
<i>Figura 27. Métodos de extracción de lípidos a partir de biomasa algal</i>	44
<i>Figura 28. Sistema esquemático de extracción de lípidos de “un solo paso”.</i>	46
<i>Figura 29. La especie Verrucodesmus verrucosus.</i>	56
<i>Figura 30. Escalado en 150 mL para la especie V. verrucosus.</i>	57
<i>Figura 31. Escalado en 10 y 16 L para la especie V. verrucosus.</i>	58
<i>Figura 32. Conteo celular mediante cámara Neubauer.</i>	59
<i>Figura 33. Biomasa húmeda después del proceso de sedimentación.</i>	61
<i>Figura 34. Biomasa seca microalgal.</i>	61
<i>Figura 35. Extracción de Pigmentos (Clorofila a y Carotenoides).</i>	63
<i>Figura 35. Extracción de lípidos totales.</i>	64

<i>Figura 37. Cuantificación de lípidos totales por espectrofotometría.</i>	65
<i>Figura 38. Curva de calibración para la cuantificación de lípidos totales.</i>	65
<i>Figura 39. Extracción de lípidos neutros vía Soxhlet y recuperación del solvente.</i>	66
<i>Figura 40. Equipo para el análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</i>	67
<i>Figura 41. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas.</i>	68
<i>Figura 42. Muestras de referencia para la determinación de Amonio en los medios de cultivo</i>	69
<i>Figura 43. Curva de calibración para la determinación de la concentración de amonio.</i>	70
<i>Figura 44. Método de ácido ascórbico para la determinación del Ortofosfatos en los medios de cultivo</i>	71
<i>Figura 45. Curva de calibración para la determinación de la concentración de ortofosfatos.</i>	72
<i>Figura 46. Suma progresiva de duplicaciones de Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo.</i>	74
<i>Figura 47. Cinética de crecimiento para la especie Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo para un volumen de 150 mL.</i>	76
<i>Figura 48. Cinética de crecimiento para la especie Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo para un volumen de 10 y 16 L.</i>	77
<i>Figura 49. Suma progresiva de duplicaciones de Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo en 10 y 16L.</i>	78
<i>Figura 50. Producción de Clorofila a para la especie Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo.</i>	83
<i>Figura 51. Producción de carotenoides para la especie Verrucodesmus verrucosus en diferentes medios de cultivo.</i>	84
<i>Figura 52. Remoción de Amonio en diferentes medios de cultivo para la especie V. verrucosus.</i>	85
<i>Figura 53. Remoción de Ortofosfatos en diferentes medios de cultivo para la especie V. verrucosus.</i>	86
<i>Figura 54. Contenido de lípidos totales para la especie V. verrucosus en diferentes medios de cultivo.</i>	88
<i>Figura 55. Comparativa entre los espectros FTIR de los extractos obtenidos de la biomasa de V. verrucosus y aceite de canola.</i>	91
<i>Figura 56. Comparativa entre espectros FTIR de la biomasa seca de V. verrucosus antes y después de la extracción de aceite.</i>	92

Agradecimientos

INDICE

Abstract	i
Resumen	iii

INTRODUCCIÓN

Problemática	v
Hipótesis	v
Objetivo General	v
Objetivos Específicos	v

Capítulo I

1.	Fundamentos Teóricos	2
1.1	Las microalgas	2
1.2	Clasificación	3
1.3	Fotosíntesis	4
1.3.1	Fase Luminosa	4
1.3.2	Fase Oscura	5
1.4	Aplicaciones	6
1.4.1	Energéticas	7
1.4.2	Alimentos	8
1.4.3	Ambientales	9
1.4.3.1	Fijación de CO ₂	9
1.4.3.2	Tratamiento de Agua Residual	10
1.4.4	Otros Usos	11
1.5	La especie <i>Verrucodesmus verrucosus</i>	13
1.6	Microalgas y Lípidos	14
1.6.1	Definición y funciones metabólicas	14
1.6.2	Biosíntesis	15
1.6.3	Factores que determinan su producción	17
1.7	Lípidos y Biodiesel	20
1.7.1	Biodiesel de microalgas	20
1.7.1.1	Ventajas del biodiesel de microalgas	21
1.7.1.2	Problemas a los que se enfrenta	22
1.8	Proceso de producción de microalgas	22
1.8.1	Selección de la especie	22
1.8.2	Cultivo de Microalgas	23
1.8.2.1	Principales factores de crecimiento	23
1.8.2.1.1	Luz	23
1.8.2.1.2	Temperatura	24

1.8.2.1.3	pH	25
1.8.2.1.4	Nutrientes	25
1.8.2.1.5	Fuente de Carbono	26
1.8.2.2	Sistemas de Cultivo	27
1.8.2.2.1	Sistemas Abiertos	28
1.8.2.2.2	Sistemas Cerrados	30
1.8.2.2.2.1	Tipos de Fotobioreactores	33
1.8.2.2.2.2	Tubulares	33
1.8.2.2.2.3	Planos	34
1.8.2.2.2.4	Columna Vertical	34
1.8.2.2.2.5	Tanques de Agitación	35
1.8.2.2.2.6	Sistemas Híbridos	36
1.8.3	Cosecha de Microalgas	37
1.8.3.1	Métodos de Cosecha	38
1.8.3.1.1	Centrifugación	38
1.8.3.1.2	Sedimentación	39
1.8.3.1.3	Floculación	40
1.8.3.1.4	Filtración	40
1.8.3.1.5	Flotación	41
1.8.3.1.6	Métodos Electrolíticos	42
1.8.3.1.7	Otros desarrollos	42
1.8.4	Extracción de lípidos	44
1.8.4.1	Métodos de Extracción	45
1.8.4.1.1	Métodos Mecánicos	45
1.8.4.1.2	Métodos Químicos	46
1.8.4.1.3	Métodos Biológicos	47
1.8.4.2	Ácidos grasos	49
1.9	Bioremediación ambiental con microalgas	51
1.9.1	Aguas Residuales	51
1.9.2	Lixiviados Orgánicos	52
1.9.3	Tratamiento de efluentes residuales con microalgas	52

Capítulo II

2.	Materiales y métodos	55
2.1	Selección de especie	55
2.1.1	Aislamiento	55
2.1.2	Morfología	55
2.2	Condiciones de cultivo	57
2.2.1	Escalamiento 150 mL	57
2.2.2	Escalamiento a 10 y 16 L	58
2.3	Determinaciones físicas	59
2.3.1	Conteo Celular	59
2.3.2	Ecuaciones de crecimientos celular	60
2.3.3	Cosecha y Secado	60

2.3.4	Determinación de peso seco	62
2.4	Determinaciones analíticas	62
2.4.1	Producción de pigmentos	62
2.4.2	Determinación de lípidos totales	63
2.4.3	Extracción de lípidos	66
2.4.4	Análisis cualitativo de la biomasa mediante FTIR	67
2.4.5	Perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases y masas	68
2.4.6	Análisis de remoción de nutrientes	68
2.4.6.1	Determinación de Amonio (NH ₄)	68
2.4.6.2	Determinación de Ortofosfatos (PO ₄)	70

Capítulo III

3.	Resultados y discusión	74
3.1	Evaluación de la cinética de crecimiento	74
3.1.1	Crecimiento y análisis en 150 mL	74
3.1.2	Crecimiento y análisis para el escalado en 10 y 16 L	77
3.2	Evaluación de los rendimientos de la producción de biomasa	81
3.3	Análisis de la calidad de la biomasa con base en el contenido de pigmentos	82
3.4	Evaluación de la remoción de Amonio y Ortofosfatos	84
3.5	Análisis del contenido de lípidos de la biomasa	88
3.6	Análisis del extracto de lípidos contenidos en la biomasa	90
3.6.1	Análisis del extracto	90
3.6.2	Análisis de la biomasa residual previa y posterior al extracto de lípidos	91
3.6.3	Rendimiento de extracción de lípidos	93
3.6.4	Perfil de ácidos grasos	94
4.	Conclusiones	98
4.1	Recomendaciones	100
5.	Referencias	102
6.	Anexo	
6.1	Producción Científica	125
6.2	Actividades Académicas	125

Abstract

In recent years, due to the increasing of energy demand, as well as the environmental problem that we face, new technologies have been developed and promoted to overcome these difficulties. Bioenergy tries to find sustainable processes from its formulation at lab scale to its execution at large scale like most of the renewables. The study of microalgae has captured the interest of many researchers around the world since the 1940s, firstly for food applications and recently as a potential source of biofuels, such as biogas, bioethanol, biodiesel and biohydrogen, as well as environmental bioremediation system such as mitigation of atmospheric CO₂ and wastewater treatment.

This Doctoral thesis shows an overview of the microalgae culture process, highlighting the state of the art remarks, from the species selection, going through culture media and culture systems, to different biomass harvesting and drying methods, the oil extraction techniques and lipid quantification that have been reported in the literature. Furthermore, *Verrucodesmus verrucosus*, a local microalgae was used for experiments that were carried out to determine its viability as a potential source for lipid production that can be transformed in biodiesel, as well as its nutrients removal capacity in wastewater and animal manure leachate.

Verrucodesmus verrucosus has not been reported in bioenergy and bioremediation fields, therefore was morphologically classified by the Laboratory of Applied Phycology of the Metropolitan Autonomous University Campus Iztapalapa (UAM-I). This species showed advantages as a source of lipids as well as species with nutrients removal potential from wastewater and leachates. *Verrucodesmus verrucosus* was cultured in media that derived from animal waste (lamb, earthworm, and elephant) and wastewater, the latter was collected from the university wastewater treatment plant. As control media, a commercial foliar fertilizer was used as a nutrient baseline. The project was carried out due to the urgency of using waste from agroindustry processes and those generated by anthropogenic activities (wastewater), reducing the water impact and the use of industrial fertilizers. In addition to these benefits, carbon dioxide from the air is absorbed by microalgae.

Verrucodesmus verrucosus had a considerable growth in all the tested culture media, mainly in wastewater and lamb leachate. The biomass production was 0.771, 0.397 and 0.4935 g L⁻¹ for the control media, wastewater, and lamb leachate, respectively. A relevant result obtained by this study was the lipid content, about 37% of total lipids from algae cultivated in wastewater being very close to 38% of the control media. This demonstrate the great potential for the use of this resource. Oil extraction yields, attached with a fraction of other compounds, were above 18% for wastewater and 14% for lamb leachate. Gas and mass chromatography showed that the lipid fraction of the microalga contains mostly saturated and unsaturated fatty acids such as C8:0, C12:0, C14:0, C15:0, C18:0, mostly C16: 0 and C18: 19t (n-9). Suggesting that the obtained oil is suitable for biodiesel production. Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) analysis, showed that the resulting biomass by the oil extraction treatment via Soxhlet can still be used for another kind of treatment, like anaerobic digestion, sugar fermentation or biomass gasification, adding value to *Verrucodesmus verrucosus* of renewable products.

Resumen

En los últimos años, debido a la creciente demanda energética, así como la problemática ambiental a la que nos enfrentamos, se han impulsado y desarrollado tecnologías que den respuesta a dichas problemáticas. Particularmente el estudio de la bioenergía busca establecer procesos cada vez más sustentables desde su formulación hasta su puesta en marcha. El estudio de las microalgas ha captado el interés de muchos investigadores alrededor del mundo desde la década de 1940, en un principio por sus aplicaciones como alimento y recientemente como fuente potencial para la generación de bioenergéticos tales como biogás, bioetanol, biodiesel, biohidrógeno, así como sistema de bioremediación ambiental para la mitigación de CO₂ de la atmósfera y tratamiento de aguas residuales.

Esta tesis Doctoral estudia, en un principio, las generalidades del proceso de cultivo de las microalgas. Destacando particularidades del estado del arte, desde la selección de la especie, pasando por los medios y sistemas de cultivo, las diferentes técnicas de cosecha y secado de la biomasa microalgal hasta los métodos de extracción y cuantificación de lípidos que han sido reportados en la literatura. En segundo lugar, se realizó el estudio de una especie local de microalga para determinar su viabilidad como fuente potencial para la producción de lípidos que puedan ser transformados en biodiesel, así como su capacidad de remoción de nutrientes en aguas de desecho.

Con base en lo anterior se seleccionó una especie que no ha sido reportada en el área de los bioenergéticos ni de bioremediación ambiental. Clasificada morfológicamente por el Laboratorio de Ficología Aplicada de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I), la especie *Verrucodesmus verrucosus* demostró tener ventajas como productora de lípidos, así como potencial para la remoción de nutrientes de aguas residuales. La especie se cultivó en medios que principalmente provenían de desechos animales (borrego, lombriz y elefante) así como agua residual proveniente de la planta de tratamiento de la (UAM-I). Como sistema de control se utilizó un fertilizante foliar comercial como línea base de nutrientes en el medio. La ejecución del estudio se llevó a cabo debido a la urgencia de recurrir a los desechos provenientes tanto de procesos agroindustriales como los generados por actividades antropogénicas diarias (aguas residuales) y así reducir el impacto hídrico, además de la utilización de fertilizantes industriales. Sumado a estos beneficios se encuentra la utilización del dióxido de carbono existente en el aire para el crecimiento de la microalga.

La especie tuvo un crecimiento considerable en todos los medios de cultivo, principalmente en el agua residual y en el lixiviado de borrego. Los rendimientos de la producción de biomasa fueron 0.771, 0.397 y 0.4935 g L⁻¹ para el medio de control, el agua residual y el lixiviado de borrego, respectivamente. Un resultado importante obtenido por la microalga de este estudio fue su contenido de lípidos, alrededor de 37% por la especie cultivada en agua residual siendo muy cercano al 38% del medio de control, demostrando un gran potencial en la utilización de este recurso. Los rendimientos de extracción de aceite, en su mayoría junto a una fracción de otros compuestos, fue arriba del 18% para el agua residual y 14% para el lixiviado de borrego. La cromatografía de gases y masas, demostró que la fracción lipídica de la microalga contiene en su mayoría ácidos grasos saturados e insaturados tales como C8:0, C12:0, C14:0, C15:0, C18:0, en su mayoría C16:0 y C18:1 9t (n-9), los cuales son aptos para la producción de biodiesel. Por medio de análisis de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se observó que la biomasa resultante del tratamiento de extracción de aceite vía Soxhlet aún puede ser utilizado para otro tipo de tratamiento, como pueden ser digestión anaerobia, fermentación de azúcares o gasificación.

INTRODUCCIÓN

Problemática

En México alrededor del 50% de la producción de energía está destinado al transporte (gasolinas, naftas, diésel, querosenos, combustóleo), aproximadamente un 15% destinado a motores diésel. Del mismo modo las emisiones de CO₂ del sector energético corresponden en poco más de la mitad a este sector. Es necesario proponer y estudiar recursos y tecnologías sustentables en el área de los biocombustibles. Actualmente, los combustibles a partir de microalgas (o combustibles de tercera generación) sugieren una participación relevante para dar solución a esta realidad. Por otro lado, las aguas residuales y los lixiviados productos de la descomposición de los residuos orgánicos, son contaminantes que dañan los cuerpos de agua y el suelo. Se ha demostrado que las microalgas pueden remover nutrientes del agua residual o de otros medios de cultivo de desecho, evitando la eutrofización. En México se generan alrededor de 230 m³ s⁻¹(descargas municipales) de los cuales únicamente cerca del 50% se trata en plantas de tratamiento, generando un serio problema no sólo para el manejo del recurso hídrico sino del daño ambiental que esto representa.

Hipótesis

La microalga *Verrucodesmus verrucosus* cuenta con la cantidad y la calidad de lípidos necesarios para la producción de biodiesel, así como con tasas de remoción de NH₄ y PO₄ suficientes para evitar la eutrofización.

Objetivos Generales

Estudiar el proceso de cultivo de la microalga *Verrucodesmus verrucosus* y evaluar su viabilidad para la producción de lípidos, así como su capacidad de remoción de nutrientes en procesos de tratamiento de aguas residuales y lixiviados.

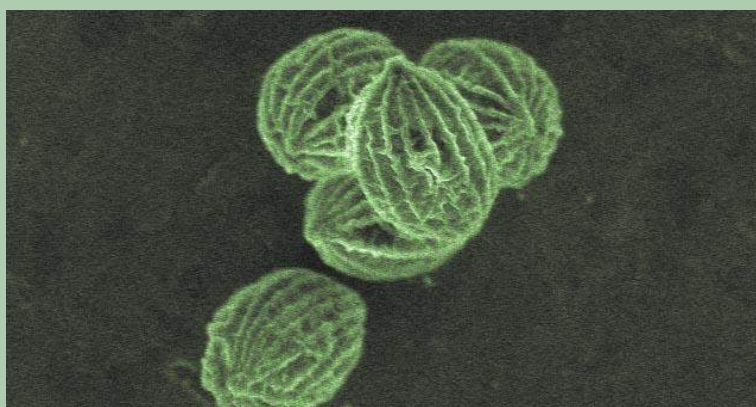
Objetivos Específicos

- Evaluar la cinética de crecimiento de la especie en medios de cultivo no convencionales (lixiviados) y aguas residuales.
- Evaluar los rendimientos de producción de biomasa en cada uno de los medios de cultivo propuestos.
- Analizar la calidad de la biomasa con base en su contenido de pigmentos.
- Evaluar la tasa de remoción de Amonio y Ortofosfatos de los medios de cultivo propuestos
- Analizar el contenido total de lípidos de la biomasa cosechada en cada uno de los medios de cultivo propuestos.
- Analizar el extracto de lípidos contenidos en la biomasa para cada uno de los medios propuestos

1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- Las microalgas
- Definición y Clasificación
- Fotosíntesis
- Aplicaciones
- La especie *Verrucodesmus verrucosus*
- Microalgas y Lípidos
- Lípidos y Biodiesel
- Cultivo y estudio de microalgas
- Bioremediación ambiental con microalgas



1. Fundamentos Teóricos

1.1 Las microalgas

Las microalgas son reconocidas como las formas de vida más antiguas sobre la tierra (*Song et al. 2008*). Se les nombraba plantas primitivas o talofitas ya que carecen de raíces, tallos y hojas. Tienen clorofila como pigmento primario para realizar la fotosíntesis, y a diferencia de los cultivos terrestres, tienen una mayor eficiencia en cuanto al acceso de agua, CO₂ y nutrientes se refiere, por ello cuentan con una mejor conversión de energía solar a biomasa. Fijan aproximadamente el 50% del carbón orgánico del planeta. Son microorganismos ubicuos, es decir se encuentran en una gran variedad de ambientes. Se pueden cultivar en medios autótrofos, heterótrofos y mixotróficos. Funcionan como productores primarios en la cadena alimenticia de mares, ríos y lagos, conocidos como fitoplancton. Su tamaño varía entre 2 y 200 µm. El número de algas se estima de entre 1 a 20 millones, mayormente microalgas. Se considera que existen alrededor de 200,000 a 800,000 microalgas, de las cuales alrededor 35 000 especies están descritas en la literatura (*Ratha y Prasanna 2012*).

En Ficología aplicada el término microalga se refiere, en sentido estricto, a las algas microscópicas y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas, como las cianobacterias, antiguamente conocidas como cianofitas. Las cianobacterias o algas verde azules cuentan con una estructura celular procarionte semejante a las bacterias, mientras que las algas eucariontes poseen núcleo, uno o más cloroplastos, así como mitocondria, aparato de Golgi y demás organelos (*Lee 2008*). Entre las más importantes se encuentran las algas verdes (Clorofitas), las algas rojas (Rodofitas) y las diatomeas (Bacilariofitas).

Las microalgas son organismos unicelulares que normalmente se encuentran en colonias magnas, adaptadas a una gran variedad de ecosistemas. Aproximadamente 15,000 especies han sido utilizadas para la obtención de nuevos compuestos originados por su biomasa (*M Cardozo et al. 2007*), como carotenoides, antioxidantes, ácidos grasos, enzimas, polímeros, péptidos, toxinas, esteroides (*Spolaore et al. 2006*). Si bien existen en cualquier latitud, se encuentran en mayor cantidad en el hemisferio norte y llegan a tener una producción anual de alrededor de 1.5 millones de toneladas, lo que contribuye a fijar alrededor del 50% del carbón orgánico de la tierra (*Frac et. al 2010*).

Las microalgas eucariontes son catalogadas en diferentes clases, principalmente por su pigmentación, ciclo de vida y estructura celular (*Khan et al. 2009*). En su composición se encuentra una alta concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos, tienen un rápido crecimiento, es decir duplican sus células varias veces en un solo día, en la fase exponencial de su crecimiento se duplican hasta en 3.5 horas (*Metting 1996; Spolaore et al. 2006*), y

pueden generar una mayor cantidad de biomasa por unidad de área en comparación con los cultivos terrestres.

1.2 Clasificación

Se clasifican en 11 divisiones, 2 procariontes (Cyanophyta/Cyanobacteria y prochlorophyta) y 9 eucariontes, (Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta) (Graham y Wilcox 2000). Las algas mayormente estudiadas son: Cyanophyceae (Cianobacterias/ algas verdeazuladas), Chlorophyceae (algas verdes), Bacillariophyceae (Diatomeas) y Chrysophyceae (incluyendo algas doradas), ver Fig.1.

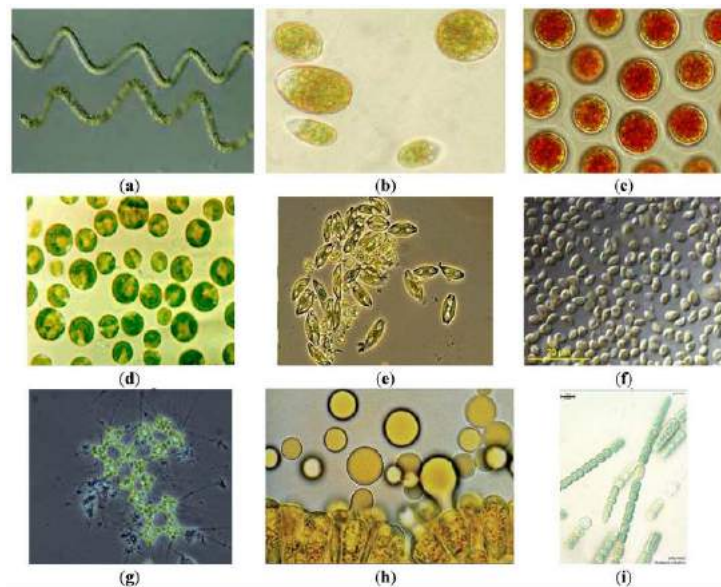


Fig.1. Especies de microalgas comercialmente utilizadas, ya sea con fines alimenticios o para bionergéticos. (a) *Arthrospira platensis* (Spirulina) cianobacteria utilizada como suplemento alimenticio; (b) *Dunaliella salina* produce beta-carotenos; (c) *Haematococcus pluvialis*, utilizada en la acuicultura y con fines nutricionales; (d) *Chlorella vulgaris*, primera microalga utilizada para alimento humano; (e) *Amphora sp.*, diatomea; (f) *Nannochloropsis sp.*, se ha convertido en una especie de uso común principalmente para fines alimenticios y biocombustibles; (g) *Micractinium sp.*, crece en aguas residuales formando "biofloculación" (h) *Botryococcus braunii*, especie que forma hidrocarburos (se pueden ver gotas de aceite); y (i) *Anabaena cylindrica*, cianobacteria fijadora de nitrógeno útil como biofertilizante (Benemann 2013).

1.3 Fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los ciclos metabólicos más importantes sobre la tierra, debido a que directa o indirectamente la mayoría de los organismos del planeta requiere de la energía proveniente del sol. La fotosíntesis es una reacción de óxido-reducción llevada a cabo en los cloroplastos de las plantas terrestres y las algas. La energía luminosa es recolectada por las moléculas de clorofila en donde a su vez el dióxido de carbono y el agua son convertidos en carbohidratos y oxígeno. Este proceso es fundamental no sólo por el oxígeno liberado para las especies que lo requieran sino también por los compuestos resultantes del mismo, tales como proteínas, lípidos y carbohidratos, por ser los más abundantes. Este proceso se divide en dos fases, la llamada fase luminosa y fase oscura, Fig.2.

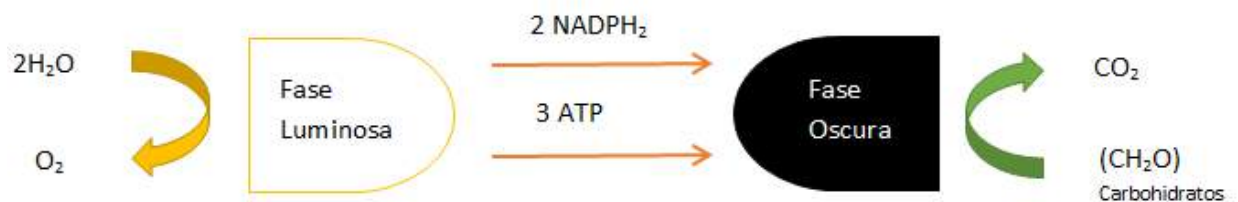


Fig.2. Proceso general de la fotosíntesis.

1.3.1 Fase luminosa

Las reacciones de la fase luminosa se llevan a cabo en los tilacoides, dentro del cloroplasto, dichos compuestos contienen cinco grandes complejos: los complejos antena, el fotosistema II (PSII), el fotosistema I (PSI), el citocromo b6f y el complejo ATP sintasa. Juntos permiten el transporte de electrones y la fosforilación. Los electrones son removidos de las moléculas de agua formando oxígeno como subproducto liberado fuera del tilacoide. Al mismo tiempo los protones fluyen desde el estroma del cloroplasto hacia el lumen y hasta el complejo ATP sintasa que genera ATP (Adenosín trifosfato) a partir de ADP (Adenosín Bifosfato) y Pi (Fosfato inorgánico) en el estroma, en donde también se forma el NADPH₂ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Ambos compuestos se utilizan posteriormente durante la fase oscura, Fig.3.

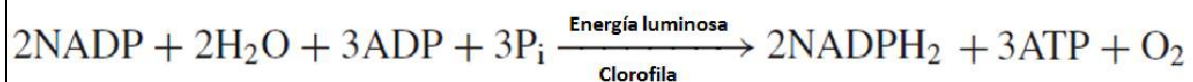


Fig.3. Reacción de Fosforilación.

1.3.2 Fase Oscura

En esta fase ocurre la fijación de carbono usando el NADPH_2 y el ATP de la fase luminosa para fijar una molécula de CO_2 . Este proceso requiere 2 moléculas de NADPH_2 y tres de ATP, Fig.4. La conversión de dióxido de carbono a azúcares u otros compuestos se lleva a cabo por el mecanismo llamado Ciclo de Calvin-Benson (*Masojídek et al. 2003*).

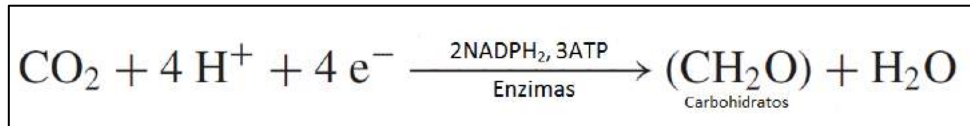


Fig.4. Asimilación de carbono y productos de la fase oscura.

En este ciclo se integran y convierten moléculas inorgánicas de dióxido de carbono en moléculas orgánicas sencillas a partir de las cuales se formarán una serie de compuestos bioquímicos que constituyen a los seres vivos. El ciclo comienza cuando el CO_2 es sintetizado mediante la enzima Rubisco (Ribulosa Bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa) incorporándolo a la ribulosa bifosfato (Ribulosa-bis-P) formando un compuesto de seis carbonos. Esta nueva molécula es muy inestable y es hidrolizada al momento formando dos moléculas de tres carbonos (glicerato-3-fosfato). En una segunda fase, se lleva a cabo la fosforilación del Glicerato-P a partir de la energía del ATP, dando lugar a un Glicerato-bis-P mediante el poder reductor de la coenzima NADPH_2 , dicha coenzima reduce esta molécula formando fósforo-gliceraldehído (Gliceraldehído-P). Esta molécula es fundamental en el ciclo de Calvin-Benson ya que sirve como base para la síntesis del resto de carbohidratos, además que directa o indirectamente conforma la cadena de biomoléculas tales como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. El proceso de regeneración continua en una serie de reacciones mediante la fijación de más moléculas de carbono con ayuda de ATP para regenerar la Ribulosa-bis-P dejándola disponible para otro ciclo (*Masojídek et al. 2003*), Fig.5.

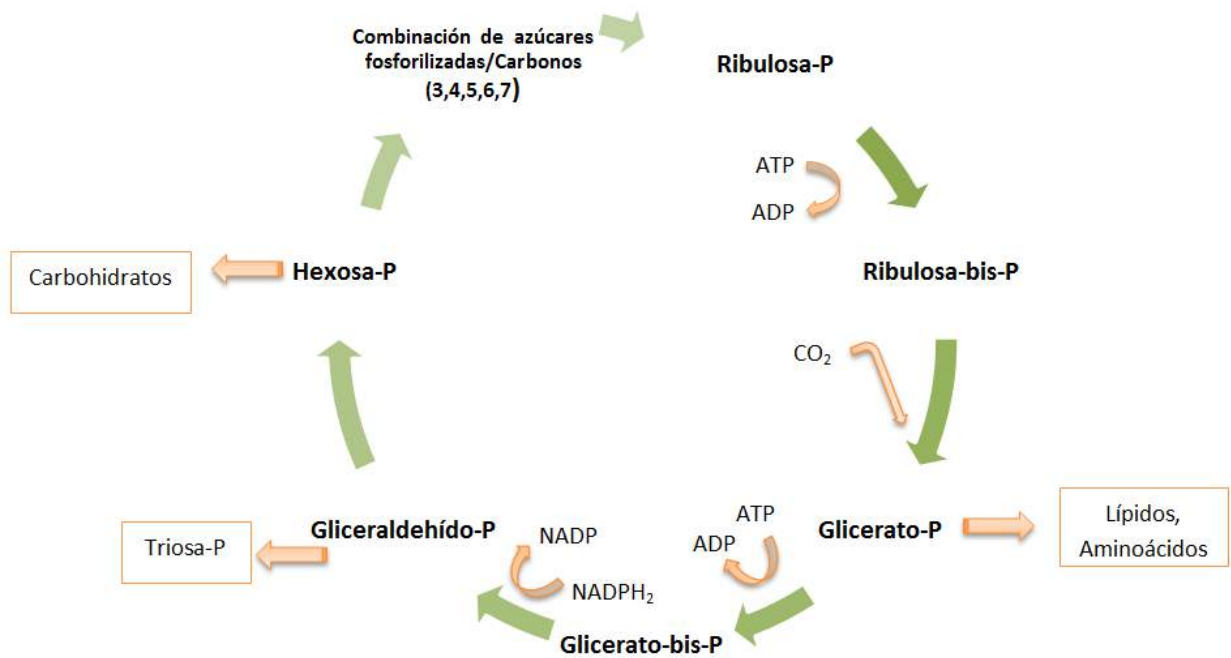


Fig.5. Ciclo de Calvin-Benson.

1.4 Aplicaciones

El uso de las microalgas no es un tema de estudio nuevo, el primer reporte sobre el uso de microalgas proviene de China, donde se utilizó *Nostoc* y otra cianobacteria comestible como alimento hace 2000 años (Gao 1998), del mismo modo los Aztecas ya utilizaban *Spirulina proveniente* del lago de Texcoco como fuente de alimento, según los reportes de la conquista española, a principios del siglo XVI (Vonshak y Richmond 1988). Desde 1940 se ha utilizado en acuicultura. Después de la segunda guerra mundial, en la década de 1950, Alemania comenzó estudios para la obtención de proteínas y grasas a partir de microalgas (Burlew 1953), más adelante se extiende a países como Estados Unidos, Japón, Israel, Italia y otros. Desde entonces también surge la idea para utilizarse en tratamiento de aguas residuales (Alfaro et al. 2008). De manera comercial, alrededor de la década de 1960, Taiwán y Japón insertan al mercado un novedoso y saludable artículo alimenticio con la especie *Chlorella* (Kawaguchi 1980; Soong 1980) en esta década también crece el interés por desarrollar sistemas de soporte para misiones espaciales. Para la década de 1970, aumenta la atención en el uso de la biomasa como fuente de combustibles y fertilizantes. Para la década siguiente, en 1980, el uso de microalgas permite el desarrollo de químicos para la industria farmacéutica y agroquímica (Goldman 1979; J Soeder 1980).

Desde entonces el campo de estudio de las microalgas ha venido creciendo debido a problemas como el calentamiento global, la disponibilidad de agua y la seguridad alimenticia, principalmente. Debido a esto, el esfuerzo actual de investigación está dirigido a campos como contaminación y tratamiento de agua, regeneración atmosférica, productos alimenticios, biocombustibles y generación de energía eléctrica.

1.4.1 Energéticas

Las aplicaciones a partir de la biomasa microalgal se han incrementado rápidamente hacia el sector energético, debido a que, a partir de dicha biomasa se pueden obtener un gran número de bioenergéticos mediante una combinación de procesos ya sean físicos, químicos, térmicos y/o biológicos. Se prevé que las microalgas sean el biopetróleo del futuro ya que los subproductos obtenidos podrían ser similares a los de una planta de refinación de crudo convencional (IEA 2008), Fig.6. Ejemplo de esto, es la producción de biodiesel en donde a partir de la extracción de los lípidos contenidos en las células de la microalga se puede, mediante transesterificación, producir biocombustible (Chisti 2007). Algunos otros estudios han realizado procesos de combustión, parcial o directa de la biomasa para producción de energía eléctrica y térmica. Del mismo modo bajo procesos de digestión anaerobia y fermentación se ha obtenido biometano y bioetanol respectivamente. La producción de hidrógeno por microorganismos ha sido un campo de estudio por varias décadas, en donde las microalgas también juegan un papel importante en la generación de este combustible (Juantorena et al. 2007, 2012; López-González et al. 2015; Ramos-Suárez et al. 2014).

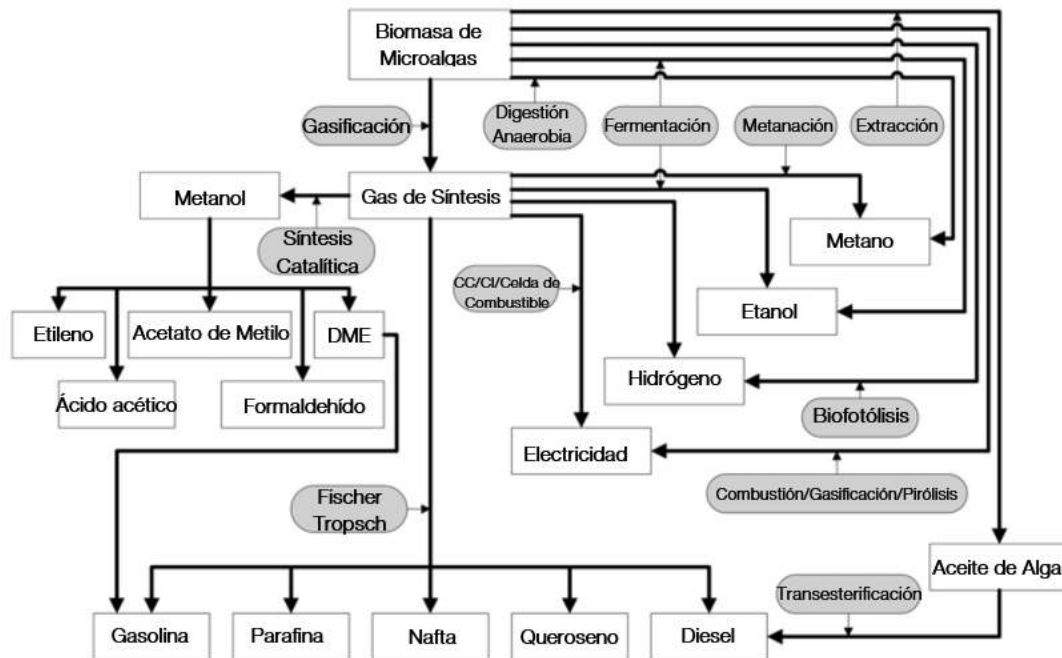


Fig.6. Productos derivados de la biomasa algal, adaptado de (Oilgae 2010).

1.4.2 Alimentos

Las microalgas contienen una fuente potencial de compuestos que pueden ser utilizados por la industria alimentaria. En un principio se estudió a las microalgas como fuente principal de proteínas y de compuestos activos para la industria farmacéutica. Tal es el caso de especies como la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, tan sólo por mencionar algunas. Debido a su capacidad para sintetizar aminoácidos pueden proveer los necesarios para la dieta tanto humana como animal. También son ricas en pigmentos como ficobiliproteínas, clorofila y carotenoides, en especial β -carotenos (hasta un 14% en peso, en especies como *Dunaliella*). Además de proteínas, las microalgas representan una fuente importante en vitaminas esenciales (A, B1, B2, B12, C, E), nicotinato, biotina y ácido fólico. Si bien son productos de alto valor agregado, están sujetos a las condiciones de cultivo (cosecha y secado principalmente). En cuanto a lípidos, las algas tienen un contenido entre 1% y 70% con algunos casos de hasta el 90%. A pesar de utilizarse actualmente para la producción de biodiesel, algunos aceites se usan como aditivos en alimentos, tales como los extractos de Omega-3 y Omega-6 de algunas especies (*Ratha y Prasanna 2012*). En la Tabla 1., se muestran los contenidos de los macronutrientes más importantes de algunas especies de microalga y su comparativa con algunos alimentos de alto consumo.

Tabla 1. Composición química de algunos productos de consumo humano y diferentes especies de microalgas (% en peso seco) .Adaptado de (*Becker 1994*).

Fuente	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
Levadura para hornear	39	38	1
Carne	43	1	34
Leche	26	38	28
Huevo	47	4	41
Frijol de soya	8	77	2
Arroz	37	30	20

1.4.3 Ambientales

1.4.3.1 Fijación de CO₂

Como estrategia biológica de mitigación de CO₂, el uso de microalgas puede ser una opción que contribuya con el objetivo de la ONU (Organización de las Naciones Unidas), en el protocolo de Kioto, de reducir en 5.2% las emisiones de gases de efecto invernadero comparadas con las existentes en 1990, además de tener a su favor un incentivo económico por bonos de carbono. Si bien las plantas terrestres contribuyen a la fijación de CO₂, tan sólo de un 3-6% de las emisiones globales de dicho gas son absorbidas por estas (*Skjånes, et al. 2007*), mientras que las microalgas y cianobacterias además de tener tasas de crecimiento superiores, 100 veces mayor (*Tredici 2010*), absorben entre 10 y 50 veces más que las plantas terrestres (*Costa et al. 2000*). Para dar una idea más clara sobre la fijación de CO₂, Las microalgas contienen aproximadamente 50% de carbón y se requieren 1.8 kg de CO₂ para producir 1kg de biomasa (*Chisti 2007*). El proceso de mitigación de CO₂ es sustentable si se combina sobre todo con el tratamiento de agua residual y remoción de metales pesados. Es posible utilizar gases de escape de las industrias, Fig.7., estos gases son tolerables para algunas especies en concentraciones inferiores al 20% viéndose afectadas por la concentración de SO_x y NO_x (*Lee et al. 2002; Negoro et al. 1991*).



Fig.7. Sistema de microalgas para la captura de emisiones de CO₂ provenientes de una planta carboeléctrica. Recuperada de (*Hautala 2013*).

El rendimiento de absorción de CO₂ está delimitado por las condiciones de crecimiento tales como: concentración de dióxido de carbono, el medio de cultivo, la temperatura, la intensidad de luz y el diseño del reactor (abierto o cerrado). En la Tabla 2, se muestran algunas especies y las tasas de fijación de dióxido de carbono, así como sus rendimientos en la producción de biomasa.

Tabla 2. Comparación de la tasa de fijación de CO₂, concentración, rendimiento de biomasa y producción de lípidos para algunas especies de microalga. Adaptada de (*Lam y Lee 2013*).

Microalga	Concentración de CO ₂ (%)	Tasa de Fijación de CO ₂ (g L ⁻¹ día ⁻¹)	Rendimiento de Biomasa (g L ⁻¹)	Contenido de Lípidos (%)
<i>Botryococcus brauni</i>	10	0.5	3.11	33
<i>Chlorella</i>	15	0.46	1.88	-
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10	0.26	1.55	24.3
<i>Chlorella</i> sp.	5	0.7	2.02	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	0.25	1.94	10
<i>Chlorella vulgaris</i>	2	0.43	2.03	45.6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	10	0.27	2.15	11.4
<i>Scenedesmus</i>	15	0.61	2.73	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	0.29	1.84	19.3
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	0.55	3.51	12.3
<i>Scenedesmus obliquus</i>	20	0.39	2.63	11 a 25
<i>Spirulina platensis</i>	10	0.32	2.18	11
<i>Chlorella vulgaris</i>	5	0.8	3.55	18.7

1.4.3.2 Tratamiento de Agua Residual

Una de las ventajas de utilizar agua residual para el cultivo de microalgas, es minimizar costos en la adición de nutrientes al medio de cultivo y al mismo tiempo remover gran cantidad de nitrógeno y fósforo del agua, evitando la eutrofización. (Li et al. 2008; Pittman et al. 2011). Las microalgas pueden utilizarse en el tratamiento de aguas residuales para varios propósitos, tales como remover bacterias coliformes, reducir la demanda química y bioquímica de oxígeno así como eliminar metales pesados (Cu²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺) (Abdel-Raouf et al. 2012).

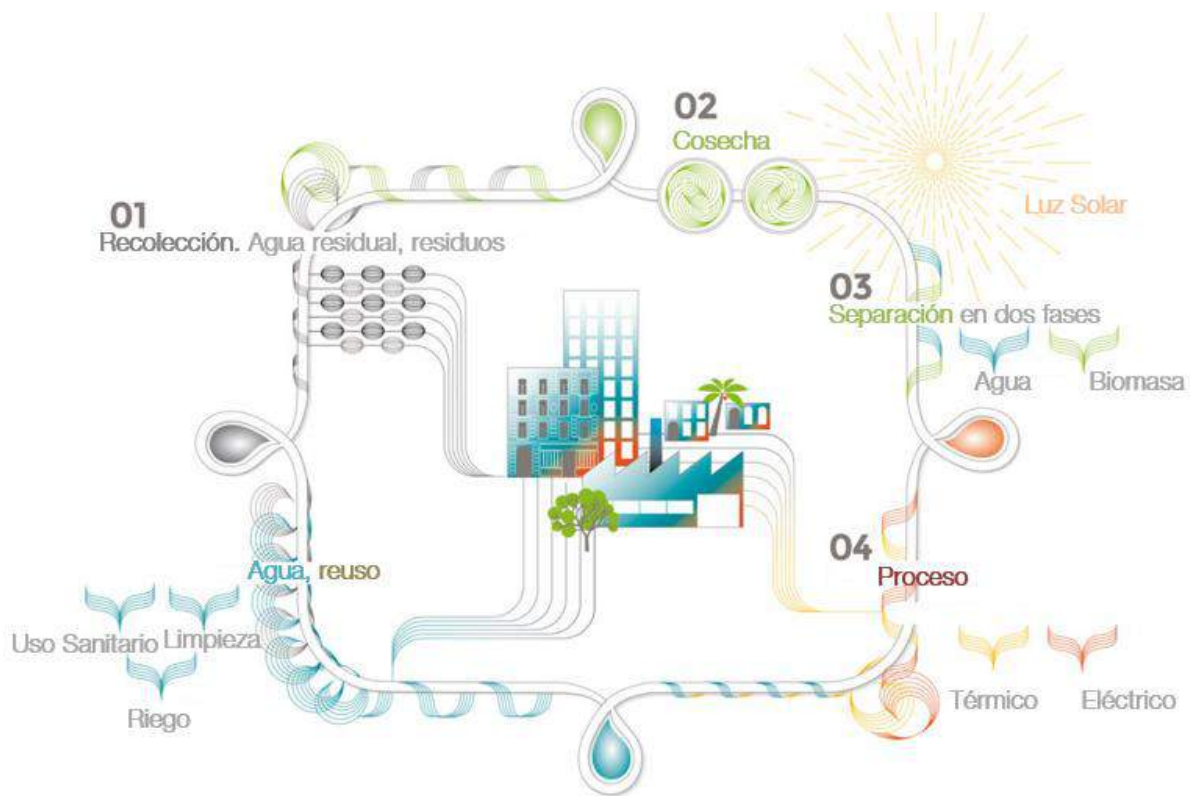


Fig.8. Sistema cerrado para el tratamiento de aguas residuales municipales a partir de microalgas. Adaptada de (Ennesys 2014).

La Fig. 8 muestra el siguiente proceso, en la primera etapa, “Recolección”, se mezclan CO_2 con aguas residuales y lixiviados de desechos orgánicos para crear un medio de cultivo estable, el cual alimentará a la microalga en un sistema de fotobioreactores. Dependiendo de las concentraciones de agua residual, lixiviados, CO_2 , así como las condiciones de luz y tipo de reactor, se lleva a cabo el crecimiento de microalgas. En la etapa de “Cosecha”, se separa la microalga del medio líquido, obteniendo agua tratada y biomasa microalgal. La biomasa producida, tiene un poder calorífico cercano al carbón lo cual es utilizada como fuente de energía (térmica y eléctrica), mientras que el agua puede ser reutilizada para uso sanitario, agua de riego o agua de limpieza. Todo este proceso está en un ciclo cerrado, lo que mejora su eficiencia, y al mismo tiempo lo vuelve autosustentable.

1.4.4 Otros Usos

Algunas especies de microalgas se han establecido en el mercado de los cosméticos, específicamente en productos relacionados con el cuidado de la piel (cremas rejuvenecedoras, regenerativas, emolientes y anti-irritantes para depilación). También se han utilizado para el cuidado del cabello y como protectores solares. Especies como *Arthrospira*, *Chlorella*, *Nannochloropsis* y *Dunaliella* han mostrado efectos antiarrugas, así como

estimulantes para la síntesis de colágeno en la piel y su reparación (Stolz y Obermayer 2005). En la Tabla 3., se muestran algunos de los productos y aplicaciones de las microalgas.

Tabla 3. Productos de alto valor derivados de microalgas y fuentes alternativas. Adaptado de (Borowitzka 2013).

Producto	Fuente Potencial o existente de alga	Fuentes alternativas	Aplicaciones
β -Caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Blakesleya trispora</i> , sintético(hongo)	Pigmento (alimento), Provitamina A, antioxidante
Aastaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , sintética (levadura)	Pigmento (acuicultura), antioxidante
Cantaxantina	<i>Chlorella</i> spp., otras algas verdes	<i>Dietzia natronolimnaea</i> , sintética (bacteria)	Pigmento (acuicultura, avicultura y alimentos)
Zeaxantina	<i>Chlorella ellipsoidea</i> ; <i>Dunaliella salina</i>	Chile (<i>Capsicum annum</i>); Cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>), sintético	Pigmento de alimentos, antioxidante
Luteina	<i>Scenedesmus</i> spp., <i>Muriellopsis</i> sp., otras algas verdes	<i>Tagetes</i> sp., <i>Blakesleya trispora</i>	Antioxidante
Fitoeno y Fitoflueno	<i>Dunaliella</i> sp.	Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Antioxidante, cosméticos
Equinenona	<i>Botryococcus braunii</i> , cianobacterias	*	Antioxidante
Fucoxantina	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Algas pardas	Antioxidante
Ficobilinas (Ficocianina, Ficoeritrina, Aloficocianina)	<i>Cyanobacteria</i> , <i>Rhodophyta</i> , <i>Cryptophyta</i> , <i>Glaucophyta</i>	*	Pigmento natural (productos cosméticos y de alimentos), conjugados fluorescentes, antioxidantes etc.
Ácido araquidónico (Omega 6)	<i>Parietochloris incisa</i>	<i>Mortierella</i> spp. (hongo)	Suplemento nutricional
Ácido eicosapentaenoico (Omega 3)	<i>Nannochloropsis</i> spp., <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Monodus subterraneus</i> etc.	Aceite de pescado	Suplemento nutricional
Ácido docosahexaenoico	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium</i> spp, <i>Ulkenia</i> spp.	Aceite de pescado	Suplemento nutricional
Esteroles	Muchas Especies	Diversas Plantas	Nutracéutico

Escualeno	<i>Aurantiochytrium</i> sp.	Hígado de tiburón	Cosméticos
Polihidroxicanoatos	<i>Nostoc</i> spp, <i>Synechocystis</i> y otras <i>cianobacterias</i>	<i>Ralstonia</i> sp; <i>Escherichia coli</i> (Modificada Genéticamente)	Plásticos biodegradables
Polisacáridos	<i>Porphyridium</i> spp., <i>Rhodella</i> spp., <i>varias cianobacterias</i>	Goma Guar, Goma xantana	Espesantes, agentes gelificantes, cosmético-farmacéutico

1.5 La especie *Verrucodesmus verrucosus*

Dado que el nombre asignado a esta especie es relativamente nuevo, no existen reportes sobre su utilización en el campo de la bioenergía u otras aplicaciones afines. Dicha especie pertenece al género *Verrucodesmus*, recientemente Hegewald *et al.* mediante estudios filogenéticos separó el género *Scenedesmus* en cuatro géneros más, por tanto la especie *Verrucodesmus verrucosus* es apartada de la anteriormente clasificada por Y.V.Roll (1925) como *Scenedesmus verrucosus* (Hegewald *et al.* 2013). Algunas de sus características se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Taxonomía de la especie *Verrucodesmus verrucosus*. Recuperado de (M.D. 2017).

Dominio	<i>Eucariota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Chlorophyta</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Subdivisión	<i>Chlorophytina</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Sphaeropsidales</i>
Familia	<i>Scenedesmaceae</i>
Subfamilia	<i>Scenedesmoidea</i>
Género	<i>Verrucodesmus</i>
Especie	<i>Verrucosus</i>

La especie de agua dulce presenta células ovaladas y alargadas, miden menos de 10µm. Su disposición es alternada formando cenobios de 4 a 8 células. La característica principal de *V. verrucosus* es la disposición de las células en dos series y la existencia de granulaciones a lo largo de la pared celular, ver Fig. 9. Actualmente, esta especie se ha mencionado en reportes de Brasil, Alemania y México (López-Mendoza *et al.* 2015; Ramos *et al.* 2015; Täuscher 2014).



Fig. 9. *Verrucodesmus verrucosus* bajo microscopio de luz. Recuperada de (Ramos et al. 2015; Täuscher 2014).

1.6 Microalgas y Lípidos

1.6.1 Definición y funciones metabólicas

Los lípidos son biomoléculas esenciales para prácticamente todos los seres vivos ya que desempeñan numerosas funciones biológicas. Desde el punto de vista nutricional, los lípidos de las microalgas pueden aportar ácidos grasos esenciales, como por ejemplo aquellos de la familia de los omegas (3 y 6 principalmente) así como vitaminas liposolubles (A y E) (Spolaore et al. 2006). Dentro de la célula, los lípidos sirven para la formación de la membrana celular (fosfolípidos) y por lo tanto funcionan como amortiguadores estructurales, mecánicos y térmicos. Son producidos en grandes cantidades bajo condiciones de estrés celular ya que actúan como fuente de reserva energética. En la figura 10, se muestra un análisis de lípidos intracelulares mediante microscopía confocal de barrido láser, análisis fluorescente que permite observar la evolución en la producción de lípidos a lo largo de la cinética de crecimiento, mostrando lo que reflejan muchos reportes en la literatura sobre una mayor acumulación lipídica en la fase estacionaria.

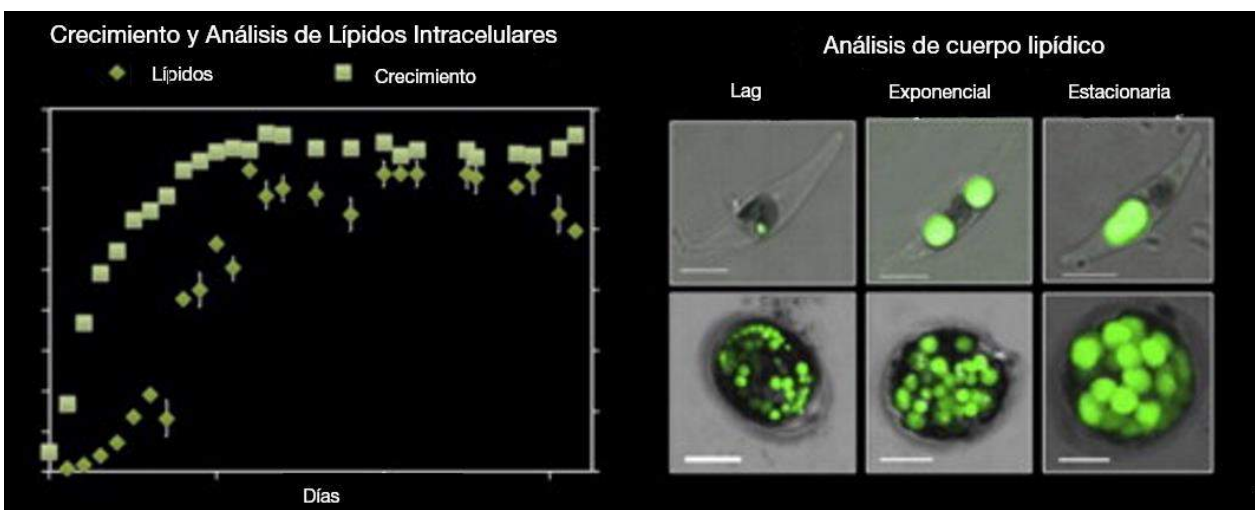


Fig. 10. Crecimiento celular y producción de lípidos en diferentes fases de crecimiento microalgal. Adaptada de (Wong y Franz 2013).

Los lípidos se clasifican principalmente en dos tipos: simples (no polares o neutros), los cuales para las microalgas son fundamentales como reserva energética. Se componen por diacilglicéridos (DAGs), monoglicéridos (MAGs), triacilglicéridos o triglicéridos (TAGs), ceras y esteroides. En general los TAGs están formados por una cadena de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos, los cuales dependiendo su extensión y sus enlaces de carbono le darán diversas propiedades a este tipo de lípidos. Las ceras, están formadas por una cadena de ácido graso y un alcohol, debido a su naturaleza hidrofóbica son altamente insolubles en agua y realizan funciones de protección para la célula. Los organismos fotosintéticos suelen tener diversos tipos de esteroides, como estigmasterol, sitoesterol, etc. Por lo general, las cantidades presentes en estos organismos suelen ser menores al resto de lípidos simples. La segunda clasificación, son los lípidos complejos (polares), estos forman las membranas celulares e incluyen a los fosfolípidos, gliceroglicolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos contienen un grupo fosfato y están unidos a una cadena de glicerol junto con ácidos grasos. Son precursores para la mayoría de los glicerofosfolípidos. La mayoría de las estructuras fotosintéticas de las microalgas, cianobacterias y plantas superiores están compuestas por diversos gliceroglicolípidos útiles para los tejidos de las membranas tilacoidales y otros organelos relacionados. Debido a sus propiedades tanto hidrofóbicas como hidrofílicas los esfingolípidos juegan un papel importante en la formación de membranas biológicas, así como precursores para la unión de cadenas muy largas en organismos fotosintéticos (*Arredondo-Vega y Voltolina 2007*).

1.6.2 Biosíntesis

Los productos de la fase luminosa de la fotosíntesis, NADPH y ATP son los sustratos del ciclo Calvin, donde la ribulosa-5-fosfato es convertida en dos triosas, por la enzima Rubisco con la adición de CO₂. Esta molécula es convertida, mediante glucólisis, en piruvato y acetil-CoA. Los lípidos pueden producirse en diferentes regiones de la microalga, en los cloroplastos se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos mientras que los TAGs, se sintetizan en el retículo endoplásmico y los tilacoides, Fig.11.

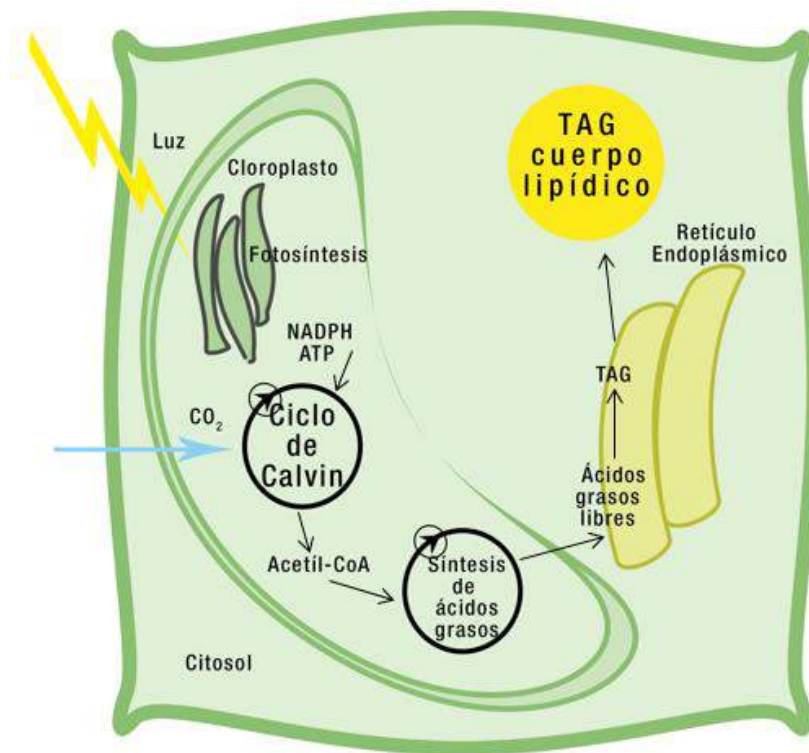


Fig.11. Ruta metabólica microalgal para la producción de Triglicéridos (TAGs).

La ruta metabólica para la síntesis de lípidos comienza con la carboxilación del acetil-CoA en malonil-CoA mediante el complejo acetil-CoA carboxilasa y bicarbonato HCO_3^- , el cual es el primer paso en diversos organismos para la síntesis de ácidos grasos. El segundo paso consiste en la conversión de malonil CoA en malonil-ACP mediante la malonil-CoA-ACP transferasa (MAT). Posteriormente, el malonil-ACP se convierte en 3-cetoacil-ACP por la enzima 3-cetoacil-ACP sintetasa, comenzando el ciclo de síntesis de ácidos grasos. Este ciclo da como producto el acil-ACP que es fragmentado mediante la acil-ACP tioesterasa (ATE) para formar ácidos grasos libres, los cuales son exportados al citosol. Algunos compuestos de acil-ACP y glicerol-3-fosfato (G3P) forman diacilglicéridos (DAG) dentro del cloroplasto que después de varios ciclos forman y expulsan (TAGs) de la membrana. En el citosol, fuera del cloroplasto, la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) es convertida en G3P mediante la G3P deshidrogenasa. El gliceraldehído tres fosfato junto con la enzima acil-CoA forman TAGs mediante una serie de proteínas producidas en el retículo endoplásmico, tales como glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPAT) y diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT) (D'Alessandro y Antoniosi Filho 2016), ver Fig.12. Los TAGs resultantes son almacenados en cuerpos lipídicos. La elongación de las cadenas de carbono de los ácidos grasos, depende principalmente de dos sistemas de enzimas, la enzima carboxílica Acetil-CoA y un complejo multienzimático llamado ácido-graso sintasa (FAS) (Liang y Jiang 2013).

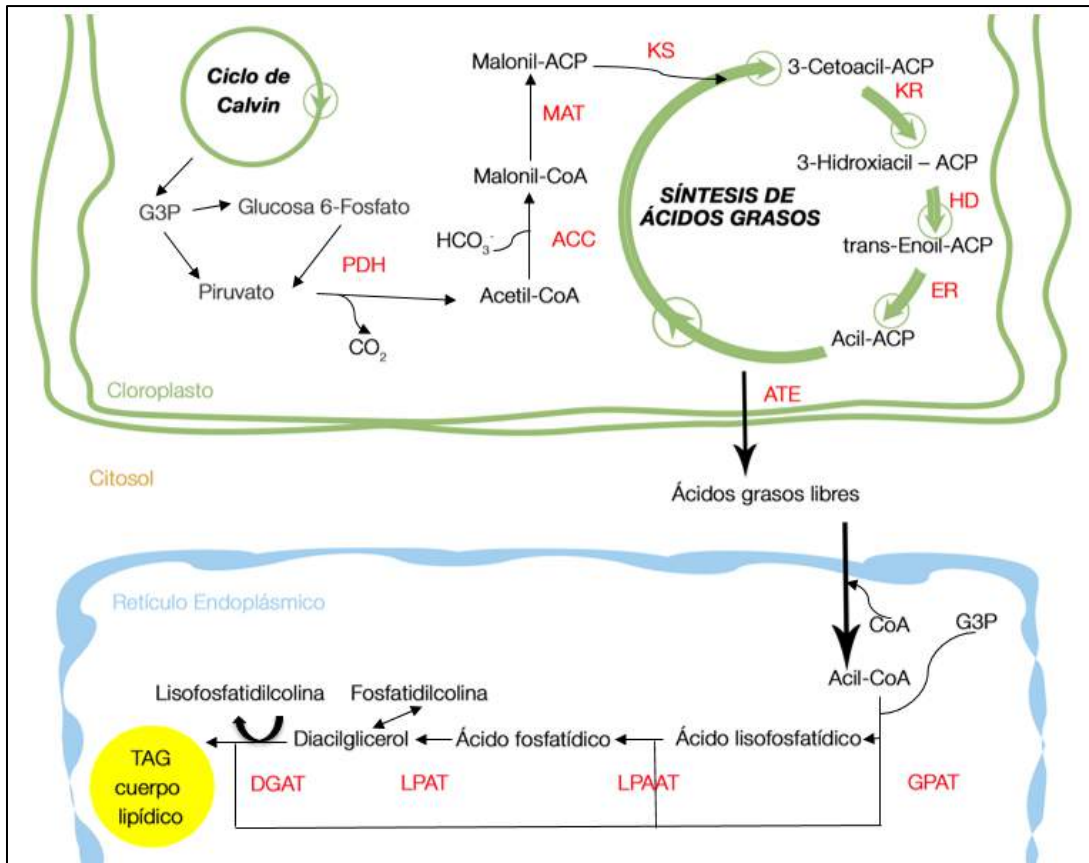


Fig.12. Biosíntesis de lípidos microalgales.

Vista simplificada de metabolitos y rutas para la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos de microalgas, los cuales se muestran en negro, mientras que las enzimas en color rojo. Los ácidos grasos libres son sintetizados en el cloroplasto mientras que los triglicéridos son formados en el retículo endoplásmico. ACC, acetil-CoA carboxilasa; ACP, proteína transportadora de acilos; ATE, acil-ACP tioesterasa; CoA, coenzima A; DGAT, diacilglicerol-acil-transferasa; ER, enoil-ACP reductasa; G3P, glicerol-3-fosfato; GPAT, glicerol 3 fosfato aciltransferasa; HD, 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa; KR, 3-cetoacil-ACP reductasa; KS, 3-cetoacil-ACP sintasa; LPAAT, ácido lisofosfatídico aciltransferasa ; LPAT, lisofosfatidilcolina aciltransferasa; MAT, malonil-CoA-ACP transacilasa; PDH, complejo piruvato deshidrogenasa; TAG, triacilglicéridos o triglicéridos. *Modificada de (Radakovits et al. 2010).*

1.6.3 Factores que determinan su producción

Las microalgas son capaces de sobrevivir en una gran variedad de climas, incluso bajo condiciones extremas, esto debido a que pueden modificar su metabolismo y adaptarse al medio. En condiciones desfavorables o bajo condiciones de estrés celular, las microalgas tienden a acumular lípidos como mecanismo de defensa (Merchant et al. 2012). Algunos factores que han sido implementados para la acumulación de lípidos descritos en la literatura

son: estrés por nutrientes (nitrógeno, fósforo, hierro, CO₂), salinidad, temperatura, intensidad de luz etc. (Breuer et al. 2013; Converti et al. 2009; Ruangsomboon et al. 2013; Toledo-Cervantes et al. 2013).

Sin embargo, si bien el estrés celular incrementa la acumulación de lípidos, la tasa de crecimiento disminuye, afectando por lo tanto la productividad celular de la especie (Converti et al. 2009). Esto dificulta el hecho de conseguir grandes cantidades de biomasa con altas productividades de lípidos, lo ideal para la producción de biodiesel. En la siguiente tabla, se muestran algunos parámetros que se han modificado para incrementar la producción de lípidos en las microalgas.

Tabla 5. Parámetros más utilizados que afectan la producción de lípidos.

Especie	Parámetro	Aumento en lípidos (% PS)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hierro	7.8 a 56.6	(Liu et al. 2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	Fuente de carbono	40 a 53	(Yeh y Chang 2012)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Temperatura	7 a 35 aprox.	(Van Wageningen et al. 2012)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Intensidad de luz	10 a 18 aprox.	(Van Wageningen et al. 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Concentración Nitrógeno	12.29 a 35.6	(Yasemin Bulut Mutlu et al. 2011)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Temperatura	7.9 a 14.92	(Converti et al. 2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Concentración Nitrógeno	5.9 a 16.41	(Converti et al. 2009)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Concentración Nitrógeno	7.9 a 15.31	(Converti et al. 2009)
Mezcla de microalgas	Fuente de carbono	5.8 a 28.2	(Prathima Devi et al. 2013)
<i>Isochrysis galbana</i> U4	Concentración Fósforo	Incrementa 50%	(Roopnarain et al. 2014)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Salinidad	16 a 36	(Bartley et al. 2013)

Recientemente se han explorado novedosas estrategias para dar respuesta a los retos convencionales que tienen que ver con la maximización de la productividad lipídica, la sustentabilidad, así como el costo-beneficio del proceso. Algunos de estos desarrollos incluyen el uso de herramientas de ingeniería genética, en donde se ha secuenciado el genoma de algunas especies de microalgas en un intento de mejorar las rutas metabólicas de síntesis de lípidos, principalmente (Tabatabaei et al. 2011). El mayor reto en esta área además de la búsqueda para aumentar la acumulación de lípidos, es el comportamiento de la especie a largo plazo, y de qué manera afecta al ecosistema que lo rodea, sobre todo en sistemas de cultivo abierto. Existen otras estrategias recientemente investigadas como son: a) cultivo en dos etapas, en donde se utilizan dos medios, uno rico en nutrientes para la acumulación de biomasa y otro carente de nutrientes para inducir el estrés celular; b)

combinación por estrés de nutrientes y de condiciones abióticas , que no son más que diseños experimentales en donde se modifican dos o más variables hasta obtener la condiciones de máximo rendimiento lipídico; c) fitohormonas , se utilizan hormonas vegetales tales como auxina o citoquinina que funcionan como reguladoras de crecimiento o división celular. Se ha visto que tienen un efecto estimulante sobre las microalgas en la producción de lípidos, carbohidratos, proteínas y carotenos; d) suplementos de ácido etilendi-amino-tetra-acético EDTA, que es utilizado principalmente para fitorremediación ya que incrementa la solubilidad de metales en el medio y facilita el consumo de estos a través de la membrana celular; e) co-cultivos microalga-bacteria, esto debido a que naturalmente las microalgas co-existen con otros microorganismos, entre ellos las bacterias. Se ha observado que esto incrementa el crecimiento microalgal a la vez que conlleva a un aumento en la productividad de clorofilas y lípidos; f) co-cultivos microalga-levadura , donde su relación simbiótica es utilizada principalmente para el tratamiento de aguas residuales , debido a su capacidad de síntesis de sustratos complejos; g) mejoras en las condiciones luminosas , ya que utilizando LEDs, tinturas y pinturas de diversos colores para modificar la intensidad y la longitud de onda, se logra un crecimiento lipídico en las microalgas; h) aditivos químicos (azida, brefeldin A, surfactantes), debido a que el uso de estos químicos en el medio de cultivo afecta principalmente el estrés oxidativo, el transporte de retículo endoplásmico así como la permeabilidad de la membrana celular. Las estrategias anteriores, pueden replicarse para la acumulación de lípidos. Algunas de ellas se muestran en la Tabla6.

Tabla 6. Estrategias novedosas que afectan la producción de lípidos.

Especie	Parámetro	Aumento en lípidos (% PS)	Referencia
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Dos etapas	36.5 a 45.5	(Álvarez-Díaz et al. 2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	pH, temperatura, luz, nitrógeno	TAGs 40%	(Breuer et al. 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ácido indolacético (AIA)	PUFA 59%	(Park et al. 2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	EDTA	Lípidos totales 28.2%	(Ren et al. 2014)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	bacteria <i>Rhizobium</i> sp.	Lípidos 112mg L ⁻¹ d ⁻¹	(Do Nascimento et al. 2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	levadura <i>Rhodotorula glutinis</i>	60 a 70%	(Yen, Chen, y Chen 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Luz LED azul	23.50%	(Atta et al. 2013)
<i>Chlorella desiccata</i>	azida de sodio	60 a 70%	(Rachutin Zalogin y Pick 2014)

Estas investigaciones han demostrado avances prometedores en cuanto a la acumulación de lípidos y producción de biomasa se refiere, sin embargo, la mayoría de los resultados reportados son a nivel laboratorio y con una minoría de especies. Son necesarios estudios a gran escala, así como la evaluación de su factibilidad técnica-económica junto con un análisis de sustentabilidad.

1.7 Lípidos y Biodiesel

1.7.1 Biodiesel de microalgas

Las microalgas como fuente de biocombustibles han cobrado gran relevancia, en particular para la producción de biodiesel (Chisti 2007; Demirbas 2010; Gouveia y Oliveira 2009; Rawat et al. 2013; Sharma et al. 2012), el cual se obtiene de diferentes materias primas. Actualmente se produce de soya, grasas animales, aceite de palma, de aceites residuales de cocina así como de *jatropha* (Barnwal y Sharma 2005; Felizardo et al. 2006; Kulkarni y Dalai 2006). A pesar de que aún no existe la comercialización masiva de biodiesel a partir de microalgas, se ha probado que estas tienen varias ventajas como materia prima, pudiendo superar a los cultivos terrestres (Mata et al. 2010).

Una primera estrategia es la selección adecuada de la especie de microalga ya que el éxito de su conversión a biodiesel depende de la cantidad de lípidos dentro de la célula, en específico el contenido de TAGs (triglicéridos), ver Fig.13. Los investigadores buscan obtener la mayor cantidad de biomasa, así como el mayor contenido lipídico, usualmente bajo condiciones de estrés celular, limitando nitrógeno, fósforo o con altas concentraciones de hierro como ya se mencionó anteriormente. Como una estrategia sustantiva a la bioremediación, se han utilizado aguas residuales como medio de cultivo, así como el uso de especies endémicas que ya están adaptadas a las condiciones locales (Illman et al. 2000; Khozin-Goldberg y Cohen 2006; Liu et al. 2008; Mansour et al. 2005).

Algunas especies cuentan con un contenido de lípidos que puede ir desde un 2% a un 70%, pero se han reportado casos de hasta 90%. Un contenido entre 20-50% es un contenido lipídico muy común en la literatura (Becker 1994; Patil, Tran, y Giselrød 2008). Asumiendo un contenido de lípidos del 30%, sin optimizar el medio de cultivo, se ha estimado una producción de lípidos entre 4.5 – 7.5 ton ha⁻¹ año⁻¹, una cantidad superior comparada con cultivos terrestres como soya (0.4 ton ha⁻¹ año⁻¹), colza (0.68 ton ha⁻¹ año⁻¹), aceite de palma (3.62 ton ha⁻¹ año⁻¹) y *jatropha* (4.14 ton ha⁻¹ año⁻¹) (Kee Lam y Lee 2011; Tsukahara y Sawayama 2005). El biodiesel producido con aceite de microalgas no contiene azufre, por lo que permite una reducción significativa de emisiones de CO₂, SO_x e hidrocarburos. Sin embargo, podría incrementar la cantidad de NO_x, comparando diferentes tipos de motores (B Johnson y Wen 2010).

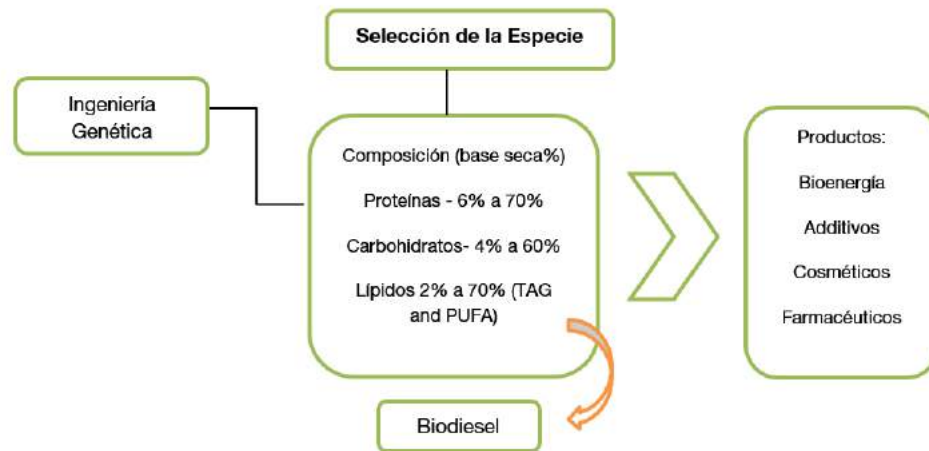


Fig.13. Composición de la biomasa algal y algunas aplicaciones.

1.7.1.1 Ventajas del biodiesel de microalgas

A continuación, se presentan algunas de las ventajas que tiene el cultivo de microalgas sobre los cultivos terrestres:

- Rápido crecimiento de los microorganismos ,hasta 100 veces más que cultivos terrestres, además de contar con un alto contenido de lípidos (*Tredici 2010*).
- No se requiere de tierra destinada a la agricultura.
- No interviene en conflictos de seguridad alimenticia.
- El mecanismo fotosintético es más eficiente (*Scott et al. 2010*).
- Remueve grandes cantidades de CO₂, contribuyendo a la mitigación de gases de efecto invernadero (*Packer 2009*).
- Generan altas tasas de remoción de nitrógeno, fósforo y metales pesados de aguas residuales (*Franchino et al. 2016; Suresh Kumar et al. 2014; Wang et al. 2013*).
- Se producen todo el año.
- Existe una gran biodiversidad de especies (*Wu et al. 2012*).
- Pueden ser cultivadas en agua dulce, salina y residual (*Wu et al. 2012*).
- Pueden producir hasta 10 veces más biodiesel por unidad de área que los cultivos terrestres comunes (*Chisti 2007; Rosenberg et al. 2008; Sheehan 1998*).

1.7.1.2 Problemas a los que se enfrenta

Por otro lado, todos los beneficios anteriormente citados conllevan un reto tecnológico muy grande. Algunos aspectos que deben estudiarse más a fondo son:

- Definir especies para contar con una mejor selección de las mismas dependiendo del producto deseado.
- Adecuar las nuevas tecnologías basadas en costo-eficiencia para su producción (*Chen et al. 2011*).
- Desarrollar protocolos o metodologías para procesos a gran escala (*Halim et al. 2011*), aunque se han publicado algunos protocolos en (*Alfaro OG. et al. 2008*).
- Analizar exhaustivamente el comportamiento de los diferentes parámetros que modifican la cantidad de lípidos producidos por los microorganismos.
- Implementar diversas modificaciones a las tecnologías del proceso (cultivo, cosecha, secado), así como al proceso de extracción y conversión a biodiesel (*Lam et al. 2012*).
- Desde el punto de vista termodinámico, el balance energético aún no está bien definido para una gran mayoría de especies (*Lam et al. 2012*).

1.8 Proceso de producción de microalgas

1.8.1 Selección de la especie

El primer paso de la producción o cultivo de microalgas consiste en la correcta selección de la especie, como se ha mencionado anteriormente. *Mata et al.* clasifican a las microalgas en tres categorías según la concentración de lípidos, 30% como un contenido bajo pero considerable para su utilización en producción de biodiesel, 50% contenido medio y un 70% como contenido alto (*Mata et al. 2010*). Recientemente, estudios como el de *Ahmad et al.* proponen un análisis multi-criterio para la adecuada selección de la especie dirigida a la producción de biodiesel (*Ahmad et al. 2015*). Los principales criterios son, concentración de aceite, tasa de producción, la tasa de consumo de los sustratos, la composición de ácidos grasos, así como los costos asociados a la cosecha y nutrientes. Algunas de las especies reportadas se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Contenido de lípidos de algunas microalgas y cianobacterias. Adaptada de (D'Alessandro y Antoniosi Filho 2016).

División	Contenido de Lípidos (%)	División	Contenido de Lípidos (%)
Cyanophyta		<i>Scenedesmus acuminatus</i>	1.58
<i>Lyngbya birgei</i>	12	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 a 40
<i>Spirulina maxima</i>	6 a 7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	12 a 14
<i>Spirulina platensis</i>	8.5	<i>Scenedesmus obliquus</i>	6.18
<i>Spirulina platensis</i>	4 a 9	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9
<i>Synechocystis pevalekii</i>	9	<i>Spirogyra sp.</i>	11 a 21
Chlorophyta		<i>Spirogyra orientalis</i>	21
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	1.58	Heterokontophyta	
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	7.9 a 20.5	<i>Navicula minima</i>	16.2
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	39.3	<i>Nitzschia spp</i>	3.68
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	32.9	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	9.4
<i>Botryococcus braunii</i>	14 a 28.6	Euglenophyta	
<i>Botryococcus braunii</i>	25 a 75	<i>Euglena acus</i>	5.78
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	<i>Euglena gracilis</i>	14 a 20
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	Rhodophyta	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19	<i>Catenella repens</i>	8
<i>Chlorella spp.</i>	10.5	<i>Ceramium manorensis</i>	8
<i>Chlorella vulgaris</i>	12	<i>Geledium pusillum</i>	9.7
<i>Chlorella vulgaris</i>	25	Dinophyta	
<i>Chlorella vulgaris</i>	14 a 22	<i>Gymnodinium sp.</i>	29.6
<i>Chlorococcum infusionum</i>	11.3		
<i>Dunaliella bioculata</i>	8		
<i>Dunaliella salina</i>	6		

1.8.2 Cultivo de Microalgas

1.8.2.1 Principales factores de crecimiento

1.8.2.1.1 Luz

La disponibilidad de luz es determinante para la productividad de biomasa microalgal, sobre todo para las especies fotoautótrofas. La iluminación puede variar de dos maneras, la irradiancia y el fotoperiodo. El primero se refiere a la cantidad de energía que incide en una superficie, la cual tiene unidades de potencia sobre área ($W\ m^{-2}$ o $J\ m^{-2}\ s^{-1}$). Aunque para la fotobiología estas unidades pueden expresarse como el número de fotones que inciden en

una superficie por unidad de tiempo o la densidad de flujo de fotones, usualmente medidos en μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (micro Einstein).

En un día soleado promedio, la irradiancia que incide en la superficie terrestre es de alrededor de 1000 Wm^{-2} , de los cuales cerca del 40% representa radiación fotosintéticamente activa o PAR (photosynthetically active radiation, por sus siglas en inglés) que abarca las longitudes de onda desde 400 nm a 700 nm. Esto equivale a 400 W m^{-2} o $1800 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por lo que un Wm^{-2} equivale a $4.57 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*Richmond y Hu 2013; Zhang et al. 2001*).

El fotoperiodo no es más que la duración en horas de luz y oscuridad al cual es sometido el cultivo. En condiciones naturales este es de 12:12 (luz: oscuridad). Pero bajo ciertos criterios de estrés lumínico algunas especies se han llevado bajo condiciones de (16:8) o hasta (24:0) (*Rai y Gupta 2016; Sarat Chandra et al. 2016*).

La respuesta de los organismos fotosintéticos a la energía que absorben, principalmente los pigmentos, varía en función de las longitudes de onda. En cuanto a pigmentos se refiere, existen tres grandes clases: clorofilas, carotenoides y ficobilinas. La clorofila es el principal pigmento que absorbe luz, dicha absorción está entre los anchos de banda de (450-475 nm) y (630-675 nm), se caracteriza por el color verde y puede ser de tres tipos a, b y c. Los carotenoides tienen un rango de absorción entre 400 y 550 nm, su color característico es el amarillo-naranja y entre sus principales funciones como pigmento accesorio es protección contra estrés lumínico. Las cianobacterias y algas rojas cuentan entre sus pigmentos antena con ficobilinas que absorben entre 500 y 650 nm (*Richmond y Hu 2013*).

Existen diversos estudios con numerosas clases de microalgas que sugieren que el contenido de lípidos es proporcional a la intensidad de la luz, esto es, que a mayor intensidad de luz mayor es la concentración de lípidos. Sin embargo, estudios realizados *Ho et al.*, se observa que entre un rango de $0\text{-}600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente, el contenido de lípidos no varía significativamente por (*Ho et al. 2012*). No obstante, lo que si va en aumento junto con la intensidad de luz es la productividad lipídica.

1.8.2.1.2 Temperatura

Para el caso del mantenimiento y la preservación de las especies de microalgas, que por lo general se mantienen en medio líquido o sólido (agar), el cultivo puede permanecer entre los 15 y 20°C y transferirse cada 6 meses. Para la etapa de cultivo y experimentación, las microalgas pueden tolerar un amplio rango de temperaturas. La mayoría tiene un crecimiento óptimo entre los rangos de 25°C a 35°C . Se ha observado que al aumentar la temperatura, la producción de ácidos grasos saturados incrementa y en contraste, al disminuir la temperatura se incrementan los ácidos grasos poliinsaturados (*Wu et al. 2013*).

Lo anterior, debido a que se mejora la estabilidad y fluidez celular de las membranas, sobre todo las membranas tilacoidales que protegen al complejo fotosintético de la fotoinhibición o fotooxidación por bajas temperaturas (*Nishida y Murata 1996*). También se ha observado que el incremento de temperatura tiene una relación con la producción de pigmentos como clorofila a, astaxantina y carotenoides. Esto puede deberse a que el aumento de la temperatura induce la formación de radicales libres de oxígeno dando como resultado estrés oxidativo que propicie la carotenogénesis o que la temperatura mejore la actividad enzimática de la carotenogénesis (*Liu y Lee 2000*). Asimismo, se asume que a temperaturas por debajo del crecimiento óptimo las células requieren más carbono y nutrientes, igualmente su volumen y contenido bioquímico incrementa (*Darley 1982*).

1.8.2.1.3 pH

El pH es un factor muy importante ya que de él depende la asimilación de CO₂, de minerales, así como las actividades metabólicas de distribución de carbono. Por lo general, un rango óptimo de crecimiento está entre 7 y 9, cercano al límite superior el carbonato puede precipitarse y evitar que los nutrientes no estén disponibles para las células (*Arredondo-Vega y Voltolina 2007*). La captación de carbono inorgánico dentro del medio puede incrementar el pH durante la fotosíntesis, y una manera de regularlo es mediante la adición de CO₂ al medio de cultivo durante la etapa de crecimiento.

1.8.2.1.4 Nutrientes

La concentración y el tipo de nutrientes es fundamental para la tasa de crecimiento microalgal. Si hay una limitación de nutrientes la célula deberá adaptarse a los nuevos requerimientos nutricionales, de tal forma que disminuyan las tasas fotosintéticas, así como las respiratorias. Una respuesta a lo anterior se ve reflejada en la mayoría de las microalgas, como una acumulación de lípidos debido a un “estrés” celular por déficit de nutrientes (*Yang et al. 2015*). Entre los más importantes se encuentran el nitrógeno el fósforo y el hierro.

El nitrógeno es fundamental para el metabolismo de las microalgas, ya que interviene en las síntesis estructurales y proteicas de las mismas. La mayoría de las especies pueden utilizar el nitrógeno en forma de amonio, nitratos, nitritos o incluso urea, aunque el primero es más eficiente para el metabolismo (*Wu et al. 2013*). El nitrógeno representa del 7 al 10% en peso seco de la célula. Cuando existe un déficit de nitrógeno, comienzan a degradarse los ficobilisomas, que son los complejos de proteínas que componen los sistemas antena en la membrana tilacoidal. Como resultado, la tasa fotosintética disminuye, si continúa la escasez de nitrógeno, el carbono es fijado y redirigido a una ruta que sintetice principalmente carbohidratos y lípidos como reserva energética, como mecanismo de supervivencia. La producción

de carotenoides es otra consecuencia de la falta de nitrógeno en el medio, que usualmente está acompañada de una reducción en el contenido de clorofila (Přibyl et al. 2016).

El fósforo es uno de los macronutrientes esenciales sobre todo en los ácidos nucleicos y muchos intermediarios metabólicos tales como fosfatos de azúcar y adenosín-fosfatos, los cuales se encargan de la movilización energética contenida en las células. Por lo tanto el fósforo es un componente que no sólo es importante para las microalgas sino para la mayoría de todos los seres vivos (Correll 1998). Los ortofosfatos son la única forma de fósforo que puede ser asimilado por los autótrofos. Estos son hidrolizados por enzimas extracelulares para incorporarlo a las células como fosfato o polifosfatos. Un déficit de fósforo en el medio se comporta de manera similar como en la escasez de nitrógeno, aunque no tan evidente. Se ha observado que a bajas concentraciones de fósforo los lípidos estructurales tales como los fosfolípidos y monogalactosil-diacilgliceroles decrecen considerablemente, en contraste con los lípidos de reserva que van en aumento como los mono, di y triacilglicéridos (Khozin-Goldberg y Cohen 2006).

El hierro es el elemento traza más importante, debido a sus propiedades oxido-reductoras y su participación en procesos clave como la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno, la respiración celular y la síntesis de ADN. Un ejemplo de esto son los experimentos de Liu et al., donde observaron un incremento de biomasa y acumulación de lípidos mediante la adición de 1.2×10^{-5} mol L⁻¹ de FeCl₃ con la especie *Chlorella vulgaris* (Liu et al. 2008).

La concentración salina afecta directamente la presión osmótica celular, incrementando la síntesis de solutos dentro de la membrana o bien, incorporándolos del medio. Este cambio en la regulación osmótica es clave para la supervivencia. Bartley et al. observaron un aumento de más del 50% de producción de TAGs al aumentar de 22 PSU a 58 PSU (practical salinity units, por sus siglas en inglés) con la microalga *Nannochloropsis salina*. (Bartley et al. 2013).

En resumen, las diferentes combinaciones de parámetros de crecimiento, así como concentraciones de nutrientes, conducen a biosíntesis diversas en condiciones de estrés celular, por lo que el estudio de un solo factor de crecimiento no puede ser determinante por sí sólo para la acumulación de los diferentes metabolitos.

1.8.2.1.5 Fuente de Carbono.

La aireación es fundamental para los cultivos, principalmente porque es la fuente de carbono inorgánico necesaria para la fotosíntesis (para los autótrofos). Gracias a esta, mejoran diversos aspectos como el intercambio de gases, la asimilación de nutrientes, los gradientes térmicos, la exposición homogénea del cultivo a la luz, así como evitar la sedimentación. Se ha visto que las mejores eficiencias de asimilación de CO₂ se dan a bajas concentraciones en el medio del 5% (v/v) aunque existen reportes que utilizan hasta un 50%

(Chinnasamy et al. 2009; Chiu et al. 2008; Ho et al. 2011). El carbono no es la única fuente de carbono inorgánico que puede ser suministrado al cultivo. En el caso de los cultivos heterotróficos, en donde el crecimiento no depende de la fase lumínica, pero sí de la fuente de carbono. Este último usualmente se suministra en forma de glucosa, fructosa, acetato, e incluso como glicerol (Perez-García et al. 2011).

1.8.2.2 Sistemas de Cultivo

Dentro del proceso de producción de biocombustibles, la selección del sistema o sistemas para el cultivo de microalgas juegan un papel importante. Dichos sistemas se han dividido en dos grupos, sistemas abiertos y sistemas cerrados, ver Fig.14. No existe una metodología estandarizada para su construcción, ya que en mayor medida depende de la especie de trabajo, por lo que ambos pueden tener ventajas y desventajas en función del objetivo y producto final deseado, ver Tabla 8. A pesar de ello, para que ambos tengan éxito en su aplicación a pequeña escala, pero sobre todo a nivel industrial, se deben cumplir ciertos requisitos que optimicen tanto el proceso fotosintético como su propio diseño. Esto son: a) intensidad y fuente lumínica efectiva b) óptima transferencia de gas-líquido (ej. CO₂, aire), c) fácil de operar, d) contar con bajos niveles de contaminación permisibles e) bajos costos de producción f) uso mínimo de área g) maximizar el aprovechamiento de nutrientes y h) control de temperatura. Lo anterior debe ser optimizado para el mayor número de especies posible. (Chen et al. 2011; Koller et al. 2012; Mata et al. 2010; Ono y Cuello 2004; Xu et al. 2009).

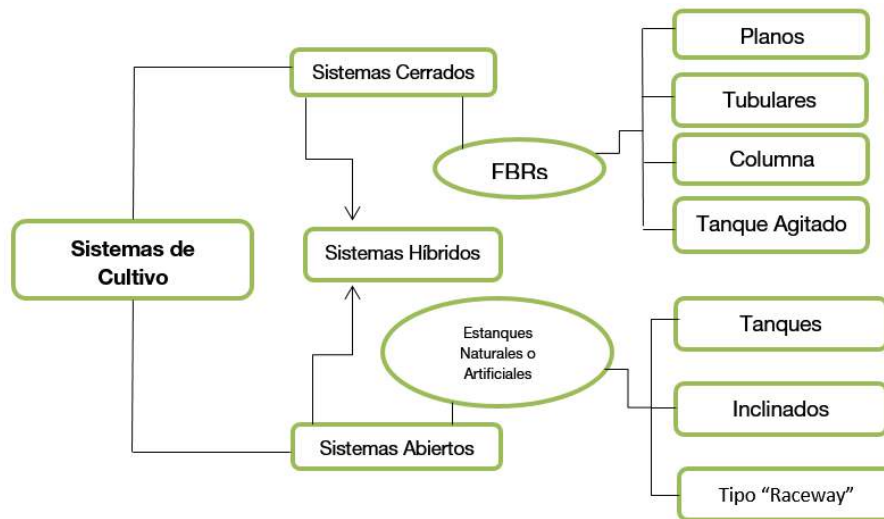


Fig.14. Sistemas de cultivo microalgal.

1.8.2.2.1 Sistemas Abiertos

Muchos de los sistemas utilizados a gran escala son los sistemas abiertos, utilizados desde la década de 1950. Algunos factores que intervienen para su selección son: las propiedades metabólicas de las microalgas, las condiciones climáticas, así como los costos de la tierra y el uso de agua. Algunos diseños, pueden ser categorizados en aguas naturales como lagos, lagunas y estanques, así como estanques artificiales. Algunos tipos son: estanques de baja profundidad, tanques, estanques circulares, sistemas inclinados y de tipo “raceway”, ver Fig.15. Estos últimos son los más utilizados actualmente (*Borowitzka 1999; Brennan y Owende 2010; Richardson et al. 2012; Suali y Sarbatly 2012*), este tipo de sistema es por lo general de baja profundidad (20–50 cm), esto debido a que las microalgas necesitan ser expuestas a los rayos del sol, los cuales están limitados a la profundidad del estanque (*Singh y Sharma 2012*). Su forma es ovalada, formando un circuito cerrado, mezclado mediante una rueda de paletas que, a su vez, evita la sedimentación. Frente a ésta, son añadidos los nutrientes y detrás de la misma se realiza la cosecha, el flujo es guiado por una serie de curvas y deflectores (*Chisti 2007; Stephenson et al. 2010; Terry y Raymond 1985*). La adición de CO₂ puede ser mediante aireadores sumergibles o directamente del aire, aunque para optimizar dicha transferencia de masa puede añadirse una columna de carbonatación para mejorar la transferencia del gas a la fase líquida en un 90% (*Putt et al. 2011*). Los nutrientes pueden provenir de las aguas de desagüe cercanas o bien mediante la utilización de aguas de tratamiento residual, lo que permite reducir el impacto hídrico, así como el consumo de nutrientes industriales. Normalmente los materiales de construcción son el concreto junto con una membrana blanca plástica.

Ventajas

La razón principal por lo que estos sistemas se utilizan es debido a sus bajos costos para su implementación a gran escala. Si bien son necesarias grandes extensiones de tierra, no necesariamente ésta debe estar destinada a la agricultura, el uso energético es mínimo en comparación a los sistemas cerrados, son de fácil mantenimiento, construcción y operación (*Rodolfi et al. 2009; Ugwu et al. 2008*). Existen aspectos que pueden optimizarse, como son: el uso de especies resistentes a ambientes extremos, como ejemplo *Dunaliella*, *Spirulina*, *Chlorella sp.*, que son cultivadas en condiciones de alta salinidad, alcalinidad y nutrición respectivamente, lo que da como resultado la elevación de la producción (*Harun et al. 2010; Lee 2001; Prasanna et al. 2010*), así como evitar la proliferación de especies invasoras.

Limitaciones

Los sistemas abiertos aún tienen algunos retos tecnológicos por desarrollar, entre los principales problemas a los que se enfrentan son: el número de especies que pueden desarrollarse de manera exitosa son mínimas, los valores reales de producción aún son bajos, el control del medio es complicado, dadas las bajas profundidades las pérdidas por evaporación son altas, el mezclado no es del todo eficiente y con ello tampoco el aprovechamiento de nutrientes y luz, existe contaminación del cultivo por otras especies de alga, protozoarios y bacterias, la temperatura es muy fluctuante ya que depende en su mayoría de los ciclos estacionales, contienen bajas tasas de concentración de biomasa en relación a los grandes volúmenes que se requieren, por lo que se necesitan grandes extensiones de tierra (Borowitzka 1999; Brennan y Owende 2010; Carvalho et al. 2006; Chisti 2007; Cuaresma et al. 2011; Schenk et al. 2008).

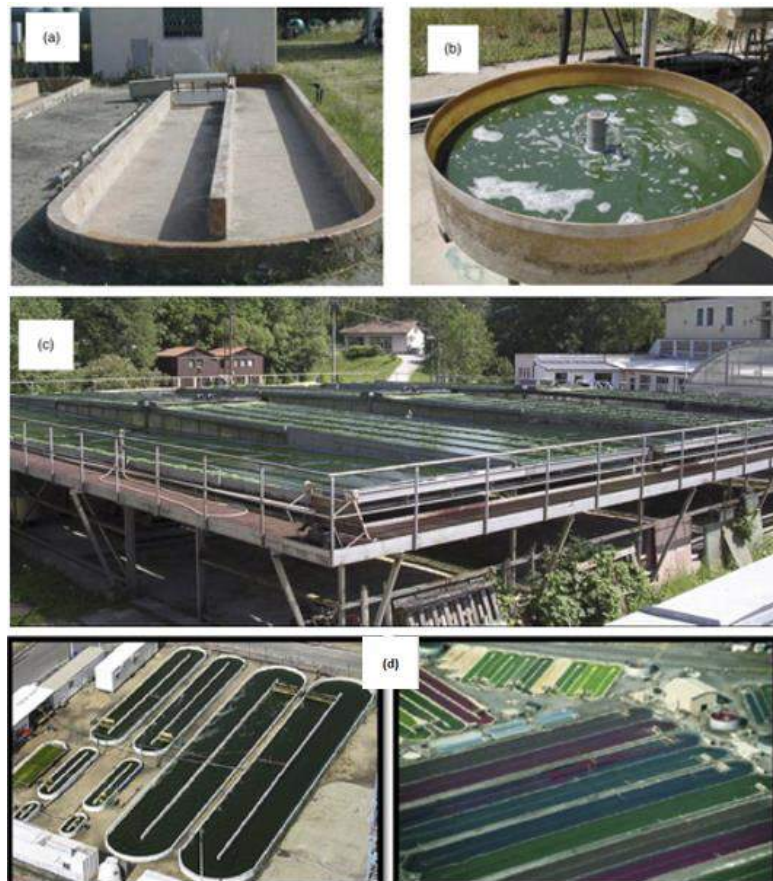


Fig.15.Sistemas Abiertos para el cultivo algal. a) Estructura tipo raceway, b) Estanque circular, c) sistema de superficie plana-inclinada, d) tipo raceway a gran escala. Adaptado de (Connelly 2014; Masojídek y Torzillo 2008).

1.8.2.2.2 Sistemas Cerrados

El control de parámetros que en sistemas abiertos es prácticamente poco factible, se logra mediante el diseño y desarrollo de sistemas cerrados, comúnmente llamados fotobioreactores, que Tredici define como reactores en los cuales sistemas fotótrofos crecen y llevan a cabo reacciones fotobiológicas, como la fotosíntesis. La característica principal es que la luz no incida únicamente en la superficie sino que deba atravesar las paredes transparentes para alcanzar al mayor número de células del cultivo, por tanto, es fundamental la aplicación de diseños que permitan reducir el trayecto de la luz e incrementen la disponibilidad de la misma (*Borowitzka 1999; Richmond 2004*).

Si bien existen diversos tipos de fotobioreactores el objetivo principal de todos ellos, es alcanzar altas productividades volumétricas y alta eficiencia en la conversión de energía lumínica, para ello debe ponerse especial énfasis en características como: la relación superficie-volumen, su orientación, así como la inclinación, la mezcla del medio y desgasificación, sistemas de limpieza, control de temperatura, transparencia y durabilidad de los materiales, que sea escalable y reproducible con bajos costos de operación y construcción (*Richmond 2004*).

Tsoglin *et al.* proponen algunos parámetros para el diseño de sistemas cerrados (*Tsoglin et al. 1996*), como son:

- El reactor debe permitir el cultivo de diversos tipos de especies de microalgas.
- Debe contar con iluminación uniforme y una rápida transferencia de masa de CO₂ consumido y O₂ generado.
- Prevenir y minimizar la incrustación de microalgas entre las paredes de reactor que eviten el paso de la luz.
- Reducir el daño celular que inhiba el crecimiento del cultivo, debido a la dinámica de fluidos.
- El fotobioreactor deberá trabajar en condiciones de intensa espuma, debido a las tasas de transferencia de masa gas-líquido.
- El diseño deberá tener partes mínimas de no iluminación.



Fig.16. Sistemas cerrados para el cultivo algal. a) FBR tubular horizontal, b) FBR horizontal en “pared vertical”, c) FBR en serie de panel vertical, d) FBR de columna. Adaptado de (Masojídek y Torzillo 2008).

Ventajas

El control sobre la contaminación del medio es mucho mayor que en los sistemas cerrados, esto conlleva a una mejor reproducción celular, mejorando la calidad de la biomasa, especialmente cuando se desean productos de alto valor (Grobbehaar 2009; Harun et al. 2011; Pulz 2001; Ugwu et al. 2008). Además, permite el uso de un mayor número de especies. Al reducirse los volúmenes de trabajo se requieren menos extensiones de tierra y al mismo tiempo la producción por unidad de volumen es más alta, reduciéndose los costos de cosecha (Carvalho et al. 2006). En los sistemas cerrados, Se obtienen menos pérdidas por evaporación y aumentan los niveles de fijación de CO_2 (Grima et al. 1999; Merchuk et al. 2000; Sierra et al. 2008) y debido a su alta relación superficie-volumen los sistemas cerrados operan con altas concentraciones celulares (Amin 2009; Davis et al. 2011).

Limitaciones

El escalado en fotobioreactores se enfrenta a un gran reto, principalmente por los altos costos de construcción, operación y mantenimiento (Amaro *et al.* 2011; Carvalho *et al.* 2006; Davis *et al.* 2011). Desde el punto de vista de materiales y construcción, el uso de vidrio puede tener ventajas tales como durabilidad, mayor eficiencia al paso de luz y fácil limpieza, aunque con costos más elevados. Tiene un incremento en peso y aumenta el riesgo de un accidente; mientras que los plásticos, aunque son más económicos su tiempo de vida es más corto y pueden opacarse con el tiempo, por lo que es de gran importancia la selección de los materiales, sobre todo para procesos industriales. La operación también enfrenta retos, tales como: iluminación artificial, sistemas de mezclado, sistemas de enfriamiento, intercambio de gases aprovechables (CO₂) y disueltos (O₂) así como en el modo de producción batch, semi-continuo o continuo (Acién Fernández *et al.* 2001; Bitog *et al.* 2011; Eriksen 2008; Gong y Jiang 2011; Pulz *et al.* 1998; Zittelli *et al.* 2003). Lo anterior genera un impacto negativo en el balance energético debido a los altos consumos energéticos. Una propuesta es la integración de diferentes tecnologías como solar y eólica para el suministro energético de dichos sistemas (Lam y Lee 2012).

Tabla 8. Principales ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo.

Sistemas Abiertos		Sistemas Cerrados	
(+)	(-)	(+)	(-)
Fácil construcción	Baja productividad	Buen control	Altos costos de operación
Fácil de operar	Menor control	Altas productividades	Difícil Escalado
Fácil Mantenimiento	Perdidas por evaporación	Alta Eficiencia lumínica	Mayor consumo energético
Menor consumo energético	Baja transferencia de CO ₂	Buen mezclado celular/gases	Difícil Mantenimiento
	Limitación lumínica	Evita la contaminación	
	Riesgo de contaminación		
	Dependencia del clima		

1.8.2.2.2.1 Tipos de Fotobioreactores

1.8.2.2.2.2 Tubulares

Consiste principalmente en un arreglo de tubos transparentes ya sean de vidrio o plásticos, también llamado colector solar, ya que en él se captura la energía proveniente del sol. Está unido a un reservorio en donde normalmente se añaden los nutrientes y se realiza el intercambio de gases, dicho cultivo circula por el arreglo solar y regresa al reservorio (Chisti 2007). El arreglo normalmente es enfriado mediante aspersion lo que genera un consumo energético extra (Kumar et al. 2011), ver Fig. 17. Las disposiciones y geometrías, pueden ser horizontales, verticales, inclinadas, helicoidales, cónicas y toroidales (Borowitzka 1999; Carlozzi 2008; Hall et al. 2003; Miyamoto et al. 1988; Molina et al. 2001; Pruvost et al. 2006; Richmond et al. 1993; Torzillo et al. 1986; Ugwu et al. 2002; Watanabe y Saiki 1997). Tiene como limitante la longitud del tubo que depende tanto del agotamiento del CO₂ como de la generación de O₂, éste último debe ser extraído ya que inhibe el crecimiento del cultivo (Eriksen 2008; Vonshak, A. and Torzillo 2004), a pesar de esto, los fotobioreactores tubulares son considerados adecuados para cultivos en exteriores, con una gran iluminación superficial, buena producción de biomasa, así como la obtención de productos de alto valor farmacéutico como la astaxantina (Janssen et al. 2003; Norsker et al. 2011).



Fig.17. Planta Industrial Arcos, España. Diseño de Fotobioreactores tubulares horizontales. Recuperado de (AlgaEnergy 2014).

1.8.2.2.3 Planos

Los fotobiorreactores planos, Fig.18., tienen formas cuboides y pueden ser tanto de vidrio, Plexiglás como policarbonato, el sistema de mezclado se lleva a cabo mediante burbujeo o rotación mecánica (Hu, Guterman, y Richmond 1996; Kumar et al. 2011; Pulz 1994; Samson y Leduy 1985), una peculiaridad es que su geometría permite una alta relación superficie/volumen, lo que produce altas concentraciones de cultivo, dando como resultado altas producciones de biomasa (Hu et al. 1998). Una ventaja frente a los tubulares es su baja acumulación de oxígeno disuelto así como sus altas eficiencias fotosintéticas (Richmond 2000), su consumo energético es bajo, carece de zonas de sombreado y mejora el consumo de CO₂. Debido a esto, son considerados como escalables para el cultivo de microalgas en comparación con los tubulares. Aunque los costos de mezclado e instalación aún son elevados (Brennan y Owende 2010; Chiu et al. 2008; Doucha, Straka, y Lívanský 2005; Norsker et al. 2011; Pires et al. 2012; Sierra et al. 2008; Stewart 2005).



Fig. 18. Fotobiorreactores planos en el sur de Portugal. Recuperada de (Necton 2013).

1.8.2.2.4 Columna Vertical

Este tipo de reactor está compuesto por un contenedor cilíndrico transparente con un difusor de gases al fondo, ver Fig.19. Se pueden dividir en reactores de columna de burbuja o columna tipo "airlift" (Degen et al. 2001; Harker et al. 1996; Kaewpintong et al. 2007; Ogbonna et al. 1999; Zittelli et al. 2003). En el primero, la difusión de los gases se realiza en

todo el volumen mientras que el segundo está dividido en dos zonas, área de entrada, mezcla y elevación de gases, Así como la zona de “bajada” en donde no hay gases mezclados. En ambos casos dicha mezcla se lleva cabo a través del difusor sin necesidad de agitación mecánica. Pueden ser iluminados artificialmente tanto de manera interna, como externa (Eriksen 2008; Suh y Lee 2003). El reactor de columna vertical ofrece muchas ventajas por lo que se ha vuelto muy utilizado. Esto por ser de bajo costo, compacto, ser viable para su escalado, de fácil operación, cuenta con un mezclado eficiente de patrones hidrodinámicos homogéneos, con una tasa de transferencia de masa muy alta, con ausencia de incrustaciones en las paredes y puede utilizarse tanto en cultivos exteriores como interiores (Bitog et al. 2011; Kaewpintong et al. 2007; Suali y Sarbatly 2012; Vunjak-Novakovic et al. 2005).



Fig.19. Fotobioreactores de columna en Alicante, España. Recuperada de (Yeomans 2013).

1.8.2.2.2.5 Tanques de Agitación

Es la manera más sencilla que hay para el cultivo de microalgas, el sistema se compone principalmente de un tanque con impulsores de diferentes tamaños para su agitación, el CO_2 es suministrado por burbujeo desde el fondo del tanque, la iluminación puede ser tanto externa como interna, su desventaja radica en la baja relación superficie volumen por lo que sus producciones no son tan altas como los fotobioreactores mencionados con anterioridad, Fig. 20.



Fig. 20. Fotobioreactor tipo tanque agitado. Recuperado de (Solaris 2015).

1.8.2.2.6 Sistemas Híbridos

Los sistemas híbridos combinan principalmente dos tipos de sistemas de cultivo, ver Fig. 21., mejorando el rendimiento del proceso en general. Combinan dos etapas distintas de crecimiento, en la primera etapa las condiciones de crecimiento y contaminación son controladas favoreciendo la división celular mientras que en la segunda el objetivo es establecer condiciones de estrés celular para provocar la síntesis de lípidos (Greenwell et al. 2010; Huntley y Redalje 2006; Rodolfi et al. 2009; Singh y Sharma 2012).



Fig. 21. Combinación de sistemas abiertos y cerrados en un mismo proceso. Recuperado de (Cellana 2016).

En la Tabla 9, se muestra la productividad de biomasa de algunas especies de microalga cultivadas en diferentes sistemas cultivo. Así como en distintos volúmenes de trabajo, en exteriores e interiores.

Tabla 9. Productividad de biomasa algal en diferentes sistemas de cultivo (abiertos y cerrados).

Especie	Tipo de Reactor	Productividad de Biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹) _{PS*}	Volumen (L)	Escala	Referencia
Consorcio (<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y diatomea pennada)	Cerrado Helicoidal (Biocoil)	0.025 _{(PSLC)**}	40	Exteriores	(Nwoba et al. 2016)
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	Tubular Vertical	0.2681	50	Exteriores	(Chen et al. 2016)
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	Tubular Vertical	0.26	250	Exteriores	(Ashokkumar et al. 2015)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Tubular Horizontal	0.52	40	Exteriores	(Michels et al. 2014)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Plano Vertical	0.038	400	Exteriores	(San Pedro et al. 2016)
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Plano tipo Airlift	2.9	10	Interiores	(Bergmann y Trösch 2016)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Columna de burbujeo	0.34	0.4	Interiores	(Ding et al. 2016)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Columna de burbujeo	0.4188	14.5	Interiores	(Peng et al. 2016)
<i>Chlorella</i> sp.	Abierto tipo Raceway	0.0727	1000	Exteriores	(He et al. 2016)
<i>Chlorella luteoviridis</i>	Estanque abierto	1.78	150	Exteriores	(Osundeko y Pittman 2014)
<i>Parachlorella hussii</i>	Estanque abierto	1.83	150	Exteriores	(Osundeko y Pittman 2014)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Abierto tipo Raceway	0.114	8000	Exteriores	(Zhang et al. 2016)

*PS, Peso Seco; **PSLC, peso seco libre de cenizas

1.8.3 Cosecha de Microalgas

En el proceso de producción de microalgas, la cosecha juega un papel muy importante, ya que es en este proceso toda biomasa microalgal es removida de la fase líquida. Esta representa entre el 20 y 30% del costo total de producción (Molina Grima et al. 2003), principalmente por el consumo energético de los equipos y su mantenimiento. La remoción de biomasa enfrenta diversos retos, ya que gran parte de la tecnología dependerá del tipo de especie. Por lo que se requiere investigación en procesos que abarquen una amplia gama de microalgas. Algunos de los principales problemas es el tamaño de célula, ya que varía entre 2 hasta 200 μm , para las células eucariontes y de 0.2 a 2 μm para las cianobacterias. Otro inconveniente es la concentración de biomasa por unidad de volumen, que varía entre 3 y 5 kg m^{-3} , lo que implica un manejo de grandes volúmenes y por lo tanto un alto consumo eléctrico (Chorus y Bartram 1999; Gudin y Chaumont 1991; Rawat et al. 2013).

La recuperación de la biomasa depende de otros factores además del tamaño de célula. Tales como la densidad de la biomasa (en promedio 1020 kg por m³) (Pieterse y Cloot 1997), el sistema de cultivo (abierto o cerrado), las condiciones de cultivo y los productos que se desea obtener. Las estrategias empleadas actualmente son, centrifugación, filtración, sedimentación y electroforesis, ver Fig.22. Técnicas como el ultrasonido y las arcillas orgánicas están todavía en desarrollo. Algunas de estas técnicas son precedidas por un proceso de floculación (Brennan y Owende 2010; Lananan et al. 2016; Lee et al. 2013; Suali y Sarbatly 2012; Uduman et al. 2010), Fig. 23. Si bien estas tecnologías han demostrado ventajas para la recolección de biomasa de microalgas, es cierto que se requiere minimizar sus inconvenientes, tales como los altos costos, así como la mejora de la eficiencia de recuperación sólido-líquido.

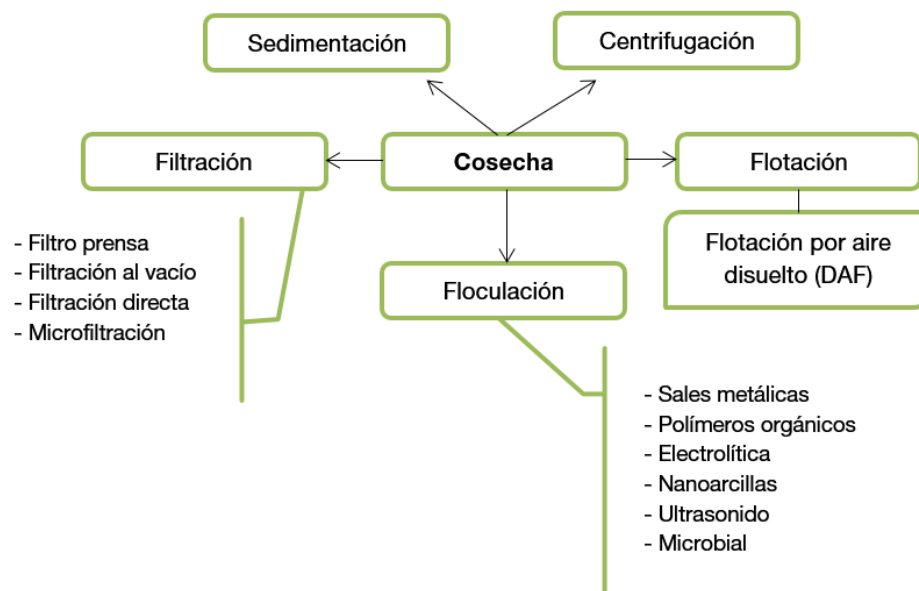


Fig.22. Métodos de cosecha algal.

1.8.3.1 Métodos de Cosecha

1.8.3.1.1 Centrifugación

Su funcionamiento se basa en la generación de fuerzas centrífugas que permiten la separación de la biomasa por diferencia de densidad. Esta técnica posiblemente sea la más rápida y confiable para la recuperación de microalgas. El equipo es fácil de limpiar así como también permite utilizar una gran variedad de especies (Shelef y Sukenik 1984). Es aplicable preferentemente sólo para productos de alto valor pero no es muy sugerido para operaciones a gran escala (Collet et al. 2013; Molina Grima et al. 2003). Cuenta con altas eficiencias de concentración (>95%) (Greenwell et al. 2010). El proceso de escalado está restringido a costos energéticos. Sin embargo (Dassey y Theegala 2013) observó que para

altas tasas de flujo y con ello grandes volúmenes, la energía disminuye considerablemente compensándolo así con bajas eficiencias.

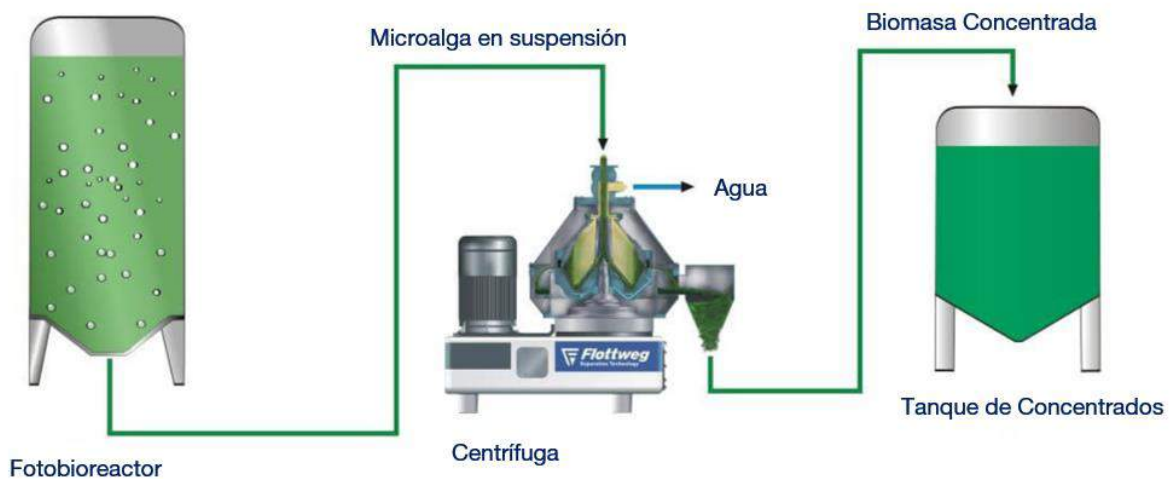


Fig.23. Centrifugación de biomasa algal. Recuperado de (Flottweg 2016).

1.8.3.1.2 Sedimentación

La sedimentación es un método muy simple de separación por gravedad. Reduce los costos de operación debido a su baja demanda energética. Este proceso puede ser optimizado mediante la adición de floculantes o separadores lamelares (Rawat et al. 2013). Por otro lado, cuenta con bajas concentraciones finales (0.5% a 3%), tiene largos periodos de asentamiento (0.1 a 2.6 cm h^{-1}), existe una posible degradación celular así como también cuenta con baja confiabilidad de recuperación de la biomasa del orden del 10% hasta el 90% (Christenson y Sims 2011). Esta altamente influenciado por el tipo de especies, principalmente su densidad y tamaño. Por ello, está limitado para microalgas que tengan altas tasas de sedimentación. Puede utilizarse como un proceso de asentamiento primario, sin embargo, requiere grandes extensiones de tierra (para estanques abiertos) así como tanques de sedimentación. A pesar de sus inconvenientes, el balance energético de la sedimentación tiene aspectos técnico-económicos positivos principalmente porque es susceptible para aplicaciones a gran escala en comparación con otras metodologías reportadas (Coward, Lee, y Caldwell 2013; Rawat et al. 2013).

1.8.3.1.3 Floculación

La floculación tiene como principio aumentar la densidad de la biomasa microalgal, la cual posee carga negativa aparente, dichos agregados incrementan también el tamaño de partícula lo que facilita su asentamiento, ver Fig.24., (Chen *et al.* 2011; Ghernaout y Ghernaout 2012). Para desestabilizar dichas cargas en las partículas de suspensión y permitir su aglomeración se usan floculantes que las separen de manera eficiente de las fases líquida, facilitando procesos posteriores como la centrifugación, sedimentación y filtración. Usualmente los floculantes suelen ser sales metálicas inorgánicas, polímeros orgánicos, inclusive microbios (Duan y Gregory 2003; Kim *et al.* 2011; Salim *et al.* 2010; Vandamme *et al.* 2010).

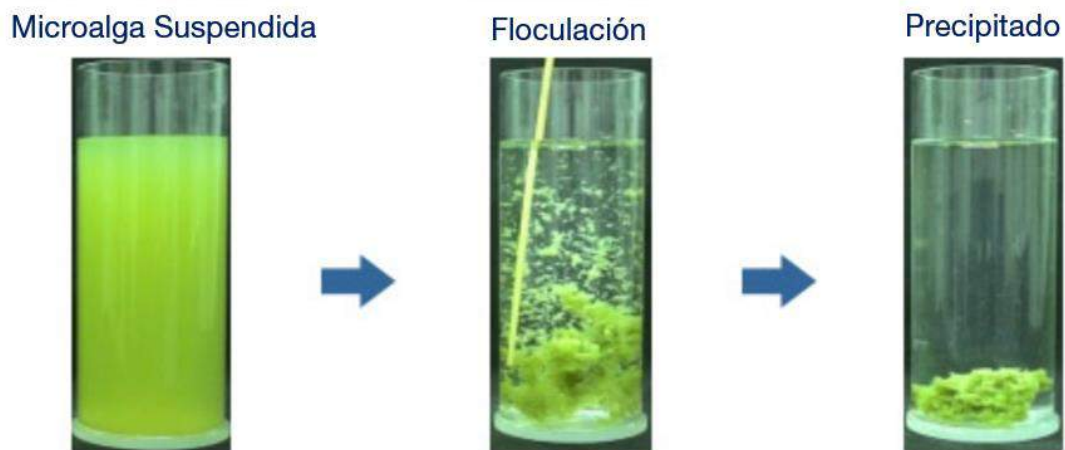


Fig.24. Proceso de floculación algal.

1.8.3.1.4 Filtración

El proceso de filtración para la cosecha de microalgas utiliza membranas, las cuales únicamente permiten el paso de las células facilitando su separación, el proceso suele ser abrasivo para muchas microalgas ocasionando su ruptura, así como la reducción de la calidad del contenido celular. Por lo que su diseño y estructura debe estar en función del tamaño de la especie empleada. Dicho proceso requiere el lavado de las membranas para mantener su eficiencia y en su defecto su remplazo debido a la suciedad almacenada. Lo que requiere de tiempo en el proceso y costos añadidos (K. Kim *et al.* 2015; Rossignol *et al.* 1999; Zhen-feng *et al.* 2011). Para especies con tamaños mayores a 70 μm se utiliza filtrado en vacío, aunque se ha utilizado la prensa de French para especies de gran tamaño como *Coelastrum proboscideum* y *Spirulina platensis* (Mohn, 1978). Se utiliza filtración directa para especies mayores a 30 μm y micro o ultrafiltración para tamaños menores (Brennan y

Owende 2010). Este método, aunque es eficiente para células frágiles, no es aplicable a grandes escalas, debido a sus bajas tasas de recuperación. Además del problema de incrustaciones en la membrana (Mata et al. 2010; Rossignol et al. 1999). Los procesos de filtración son adecuados a pequeña escala, ya que de lo contrario se requiere de altos costos de mantenimiento y operación, sobre todo por el remplazo o lavado de membranas, así como de consumo eléctrico por bombeo.

1.8.3.1.5 Flotación

La flotación es un proceso de separación en el cual burbujas de aire o gas se adhieren a la biomasa suspendida llevándola a la superficie del líquido, el éxito del proceso radica que entre más pequeñas sean estas burbujas mayor es la eficiencia debido a la relación de área por unidad de volumen (Koren y Syversen 1995), los tamaños de burbuja pueden ir desde diámetros menores a 10 μm hasta 3000 μm según el proceso (Csordas y Wang 2004; Edzwald 1995; Levin et al. 1962; Rubio et al. 2002). El método más común es el DAF (Dissolved Air Flotation, por sus siglas en inglés), un método ya utilizado para la eliminación de lodos en el tratamiento de aguas residuales. Consiste en añadir un floculante que incremente el tamaño de partícula para después generar pequeñas burbujas que eleven la biomasa microalgal, Fig. 25. Su ventaja son los bajos costos así como su aplicación a gran escala, la desventaja es la posible contaminación debido al floculante (Greenwell et al. 2010; Hoffmann 1998; Molina Grima et al. 2003). El proceso DAF remueve alrededor de 90%-99% de gran variedad de algas y es más eficiente que la sedimentación (Henderson, Parsons, y Jefferson 2008). Algunos parámetros que deben controlarse para mejorar el proceso son: presión del tanque, tasas de recirculación, tiempos de retención y las tasas de flotación de partícula (Uduman et al. 2010).

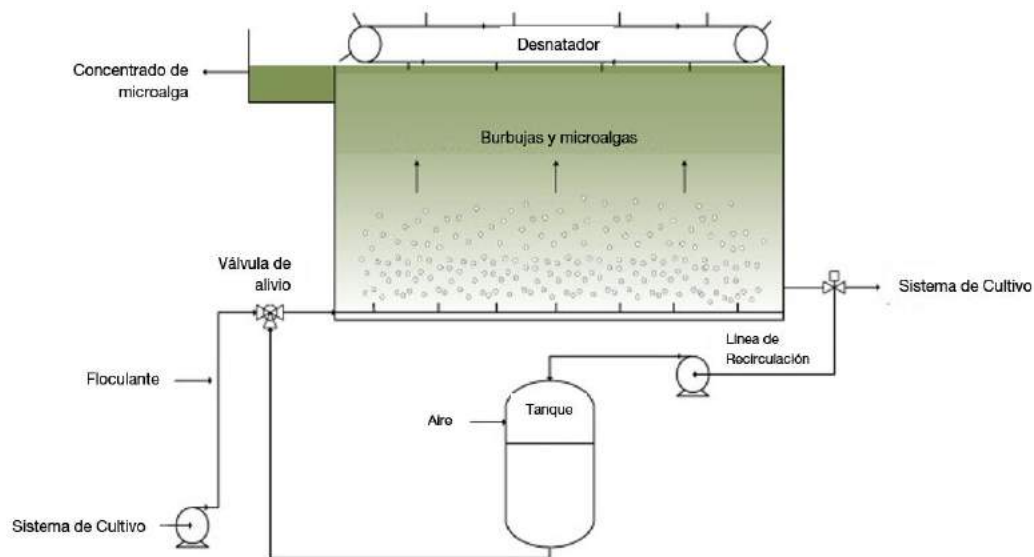


Fig. 25. Diagrama de un sistema combinado de floculación con un sistema DAF para la cosecha microalgal. Adaptado de (Gerardo et al. 2015).

1.8.3.1.6 Métodos electrolíticos

La carga negativa de las células permite que, mediante un campo eléctrico se pueda manipular el movimiento de éstas fuera de la solución, al mismo tiempo la generación de hidrógeno debido a la electrólisis provoca la adhesión del gas a las moléculas sólidas que son arrastradas a la superficie (Kumar, Yadava, y Gaur 1981; Mollah et al. 2004), este método puede ser efectivo, además bajo en costos, con cortos tiempos de operación y con bajas probabilidades de contaminación ya que no se añaden agentes químicos al medio. Sin embargo, aún tienen que desarrollarse estrategias y equipos a gran escala que controlen la temperatura del sistema, consumo energético y el mantenimiento de los cátodos debido a incrustaciones. Lo que lo hace una tecnología prometedora y con un gran campo de desarrollo. Para ejemplificar el proceso, en la figura 26 se muestra un experimento que se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 100 mL, con 90 mL de alga en suspensión, a) los electrodos se conectaron a una fuente de alimentación en corriente directa (CD), b) cultivo antes de la floculación, c) proceso durante la floculación, d) después de la floculación. Se obtuvo una recuperación de la biomasa del 90% con 40 V en casi 10 minutos.

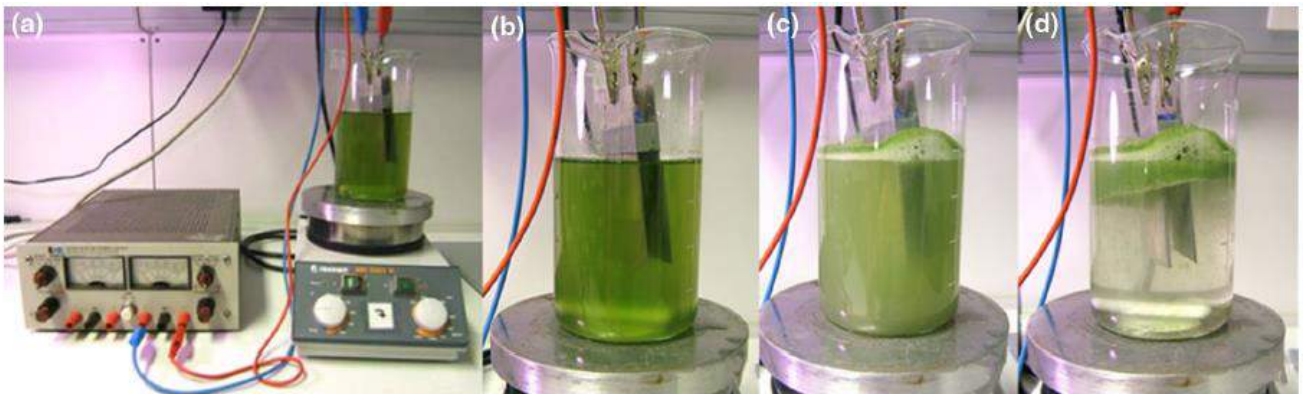


Fig.26. Proceso de electrofloculación para la cosecha microalgal. Recuperada de (Bleeke et al. 2015).

1.8.3.1.7 Otros desarrollos

Existen otras metodologías estudiadas recientemente dentro del proceso de cosecha de biomasa microalgal, como son, someter al cultivo a un campo de ondas ultrasónicas como método de agregación celular. Aunque ha funcionado a escala laboratorio aún falta mayor estudio para su escalamiento, ya que no únicamente agrega la biomasa sino también algunos otros sedimentos como metales pesados (Bosma et al. 2003). El uso de nano-arcillas como Mg^{2+} o Fe^{3+} , capaces de agregar las células para facilitar su sedimentación es de gran interés debido a sus altas eficiencias, así como su aplicación a una gran variedad de especies y medios de cultivo, además de la posibilidad de ser un agente reciclable

(Ahmad et al. 2013; Lee et al. 2013). La modificación genética, principalmente está enfocada en el incremento de la productividad de biomasa y la producción de lípidos (Georgianna y Mayfield 2012; Larkum et al. 2012), así como también en procesos que mejoren la capacidad de las células para aglomerarse, un ejemplo de ello son levaduras genéticamente modificadas que producen una proteína floculante que permita a sus células agregarse (Govender et al. 2008). Dichas tecnologías aún necesitan mayor investigación y desarrollo tecnológico para su aplicación.

En la siguiente tabla, se muestran algunas eficiencias en cuanto a recuperación de biomasa se refiere, aplicado a diferentes especies y bajo distintas metodologías de cosecha microalgal.

Tabla 10. Eficiencia de recuperación de biomasa para distintos métodos de cosecha y especies de microalga.

Especie	Método de Cosecha	Condiciones	Eficiencia %	Referencia
Scenedesmus sp.	Floculación	1.5 g L ⁻¹ of Al ₂ (SO ₄) ₃ , pH 8.5	97.9	(Reyes y Labra 2016)
Chlorella sp.	Centrifugación	2200 rpm	96	(Wang et al. 2016)
	Floculación	Óxido de hierro magnético (Fe ₃ O ₄) nanopartículas (MNPs) recubrimiento por dendrímero de Poliamidoamina (PAMAM) (80 mg L ⁻¹), pH 8.0	95	
Chlorella sp.	Bio-floculación	<i>Ankistrodesmus</i> sp., 50% (v/v), pH 7.1	82	(Lananan et al. 2016)
Aurantiochytrium sp. KRS101	Coagulación	FeCl ₃ 1.00 g L ⁻¹ , 120 min	98.8	(K. Kim et al. 2015)
	Electro-flotación	Ánodo: DSA, Cátodo: Al, 5.7 mA cm ⁻² , 40 min	59	
	Electro-coagulación-flotación	Ánodo: DSA, Cátodo: Al, 11.4 mA cm ⁻² , 40 min	89.9	
	Centrifugación	1000g, 30 min	87.2	
Prorocentrum lima	Filtración (Membrana)	PVDF 150 kDa, 240 min	99.9	(Wang et al. 2015)
	Doble-Sedimentación-Centrifugación	4h y 3h, 12,000 rpm por 10 min	89	
Policultivo	Coagulación-floculación/sedimentación	<i>Tanfloc</i> SG (20 mg L ⁻¹ / 4 días / pH 8.3	93.5	(Gutiérrez et al. 2016)
Nannochloropsis salina	Floculación-sedimentación	Al ₂ (SO ₄) ₃ 229 mg L ⁻¹ / 148 min	86.1	(Chatsungnoen y Chisti 2016)
Monoraphidium sp. FXY-10	Sedimentación	200 µM Fe ³⁺ / 12h	90.74	(Che et al. 2015)
Phaeodactylum tricornutum	Microfiltración	membranas de polivinilo fluorado (PVDF)	85-98	(Bilad et al. 2013)
Chlorella vulgaris	Microfiltración	membranas de polivinilo fluorado (PVDF)	98-100	

Policultivo	Flotación por aire suspendido SAF	FBR con 20 cm de profundidad, Duración del ciclo 7 días	80-95	(Novoveská et al. 2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biofloculación-flotación	<i>Cobetia marina</i> L03, 20 mg L ⁻¹ , 5 mM CaCl ₂	92.70	(Lei et al. 2015)
Policultivo	Gas al vacío	salinidad del 40%, flujo de aire de 10 L min ⁻¹ en difusor de microburbujas de aire	49.5	(Barrut et al. 2013)
<i>Phormidium</i> sp.	Flotación por aire disuelto por lote (BDAF)	flotación por burbujeo cargado positivamente a un 30%, taza de burbujeo >16 mV y 6 bar	85	(Bui y Han 2015)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Electro-coagulación-floculación	Electrodos de níquel, 4V, 120 min	90	(Shuman et al. 2014)

1.8.4 Extracción de lípidos

Una vez concentrada la biomasa después de la cosecha, el siguiente paso es la extracción de lípidos. Dichos lípidos son producidos al final de la etapa de crecimiento microalgal, comúnmente en la fase estacionaria. Para facilitar y optimizar la extracción del contenido lipídico, se sugiere llevar a cabo el rompimiento de la membrana celular o disrupción celular. Factores tales como temperatura y presión, principalmente, son los más utilizados para lograr dicha disrupción. Existen diversos métodos utilizados para este fin, algunos de ellos siguen la misma metodología de las experiencias con cultivos energéticos terrestres, como son el prensado mecánico, la extracción por solventes (hexano) o la extracción con fluidos supercríticos, entre otros (Belarbi et al. 2000; Demirbas 2011; Medina et al. 1995; Mendes et al. 1995; Sazdanoff 2006). La selección de la metodología está basada principalmente en la eficiencia de extracción, costos y reproducibilidad, Fig.27.

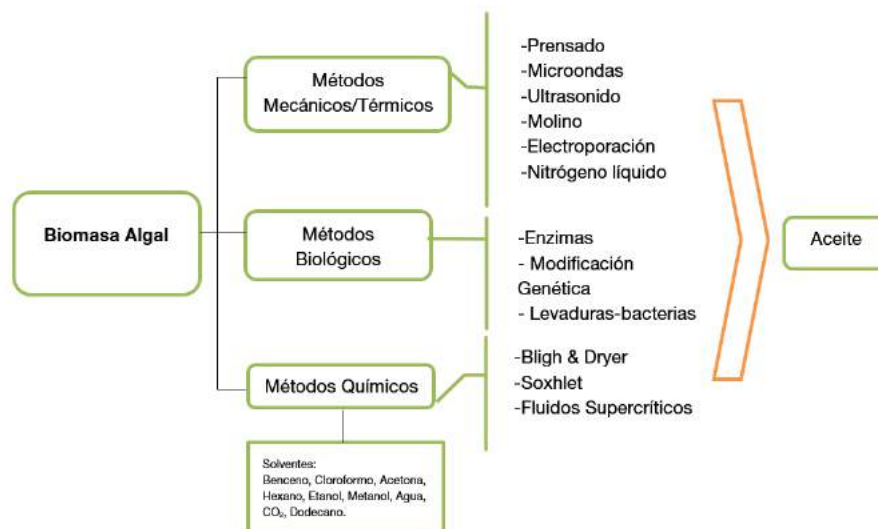


Fig.27. Métodos de extracción de lípidos a partir de biomasa algal.

1.8.4.1 Métodos de Extracción

1.8.4.1.1 Métodos Mecánicos

El método de prensas extrusoras es el más utilizado para la extracción de aceite de semillas de diversas oleaginosas. Para el uso de biomasa microalgal, del 70 a 75% de aceite puede ser extraído bajo este principio (*Topare et al. 2011*). El resto permanece adherido a la membrana celular por lo que se requiere una segunda etapa que utilice solventes para incrementar la eficiencia de extracción (*Cravotto et al. 2008*). Otra opción, es mediante ondas de alta frecuencia (sistema de microondas), ya que permiten romper los enlaces débiles de hidrógeno de la pared celular. Desde otra óptica, la propia humedad de la biomasa genera un aumento de presión lo que facilita la ruptura de la membrana, facilitando el acceso a su contenido. El control en la calidad del producto es más práctico aunque resulta difícil su escalamiento (*Balasubramanian et al. 2011; Mandal et al. 2007*). El ultrasonido utiliza el efecto de cavitación y como consecuencia la implosión de microburbujas que al colapsar en la pared celular logran su ruptura y con ello la liberación del contenido celular. Entre sus ventajas están, la mejora significativa en la extracción, las altas eficiencias, la reducción de tiempos, los altos rendimientos y bajos costos. Su dificultad radica principalmente en el escalado, (*Amaro et al. 2011; Harun et al. 2010; Mercer y Armenta 2011; Miller, Pislaru, y Greenleaf 2002; Pernet y Tremblay 2003*).

Otro método común, es el uso del “molinos de bolas” como disruptor celular, el cual consiste en agitar a altas velocidades pequeñas esferas de distintos tamaños provocando la destrucción de las paredes celulares. Este método minimiza la contaminación por fuentes externas y permite mantener la integridad química del contenido celular (*Doucha y Lívanský 2008; Greenwell et al. 2010; Günerken et al. 2013; Harrison 1991*). Al igual que otros métodos antes mencionados, su escalado aún requiere investigación. Por otro lado, la electroporación consiste en incrementar la permeabilidad de la pared celular mediante la aplicación de un campo electromagnético externo. Debido a su simplicidad, ha cobrado atención a nivel industrial (*Su et al. 2012; Flisar et al. 2014; Eckelberry et al. 2011*). OriginOil desarrolló tres funciones simultáneas a su proceso (remoción de agua, ruptura celular y extracción de lípidos) en un solo paso, lo anterior mediante un proceso registrado como fractura cuántica, una mezcla entre ciencia de fluidos, combinada con pulsos electromagnéticos y modificación de pH, Fig.28.

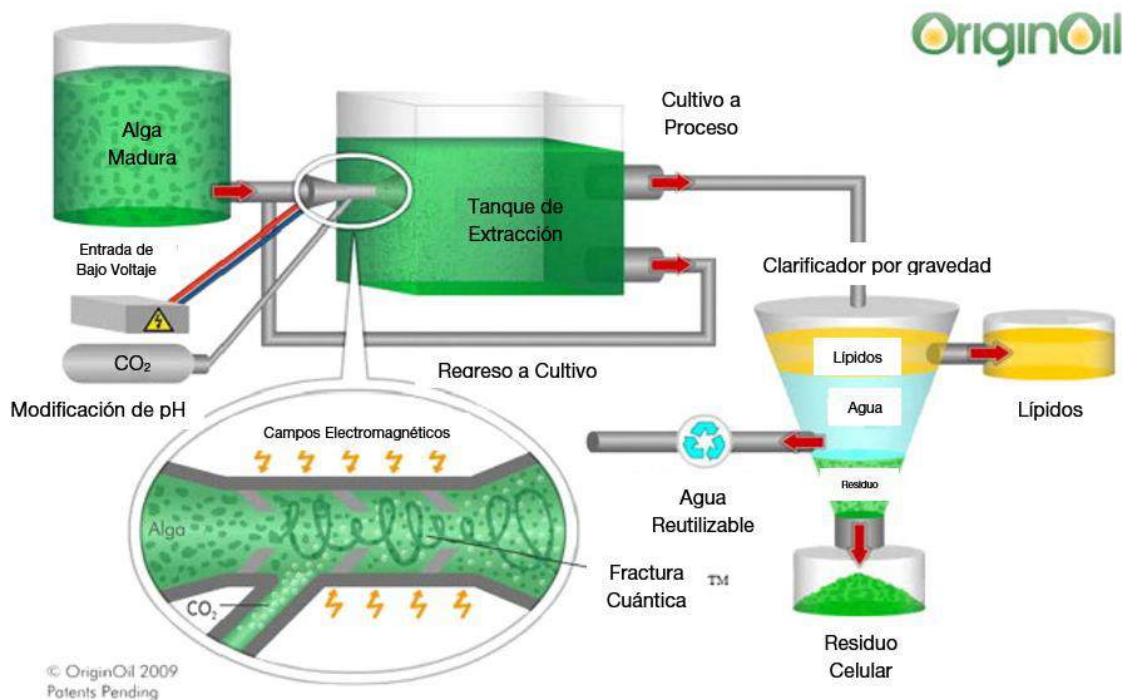


Fig.28. Sistema esquemático de extracción de lípidos de “un solo paso”. Adaptado de (Halim, Danquah, y Webley 2012).

1.8.4.1.2 Métodos Químicos

El uso de agentes químicos para la extracción de lípidos, reduce el gasto eléctrico en comparación con las extracciones mecánicas, siendo ésta su principal ventaja. El uso de solventes tiene como objetivo disolver los lípidos contenidos en la célula y formar una solución. Entre los solventes más comunes se encuentran: benceno, ciclo-hexano, hexano, acetona, cloroformo, dietil éter, etanol y metanol. Así como combinaciones hexano/etanol (Cartens *et al.* 1996) y hexano/isopropanol (Nagle y Lemke 1990). El uso de hexano y alcohol además de ser menos tóxico, separa rápidamente las fases en contacto con el agua lo que mejora el proceso (Schäfer 1998).

La utilización de solventes no-polares ayuda a romper las interacciones hidrofóbicas entre lípidos neutros, mientras que los solventes polares intervienen en la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre lípidos polares, esta combinación permite la extracción de lípidos específicos, así como la separación de otros productos como beta-carotenos y astaxantina (Molina Grima *et al.* 2003). La ventaja de estos solventes es su bajo costo y alta eficiencia, por ello es muy común su utilización en procesos de extracción de aceite.

El método más utilizado para la extracción vía solventes es el método Bligh & Dyer (Bligh y Dyer 1959), que no es más que la combinación de metanol, cloroformo y agua. Tiene eficiencias mayores al 95% de lípidos totales, aplicable a cualquier tejido celular, además de que puede ser utilizado en biomasa seca como húmeda (Iverson *et al.* 2001).

Las desventajas son las grandes pérdidas por evaporación y su toxicidad, por lo que puede ser una limitante en aplicaciones industriales (*de Boer et al. 2012*).

La extracción vía Soxhlet es una técnica de extracción sólido-líquido, usualmente en el campo de las microalgas, se utiliza hexano como solvente. Éste es evaporado y recondensado dentro de la muestra hasta completar la extracción. Tiene una gran eficiencia, aunque con largos periodos de extracción que conlleva a un alto consumo energético. Su desventaja es la complejidad para ser escalado (*Halim et al. 2011; Ramluckan et al. 2014; Ranjan et al. 2010*).

El uso de fluidos supercríticos está basado en promover la capacidad de un fluido para funcionar como uno solvente al estar por encima del punto crítico. Se ha probado con éxito su eficiencia para la extracción de aceites (*Mendes et al. 1995*). Actualmente, y como una solución ecológica, se utiliza el dióxido de carbono como solvente, bajo condiciones de punto crítico (31.1°C y 72.9 atm de presión), además de contar con bajos niveles de toxicidad y el hecho de ser un gas inerte (*Herrero et al. 2004*). El proceso comienza con el calentamiento y compresión del gas, hasta alcanzar su punto crítico. Después se inyecta en la biomasa microalgal para que funcione como solvente, provocando la solución de lípidos. La separación se hace fácilmente ya que, al volver a las condiciones atmosféricas normales, el CO₂ regresa a su estado original logrando rendimientos hasta del 100% de aceite. Dicha tecnología está limitada por el consumo energético, así como el escalado.

Dentro de las ventajas del uso de fluidos supercríticos se encuentran su alta eficiencia de extracción, el perfil de ácidos grasos obtenido en comparación con otros métodos, extracciones libres de solventes, fácil y rápida separación además de que el CO₂ puede ser obtenido de residuos industriales. Lo que impacta de manera positiva en el medio ambiente (*Crampon et al. 2013; Halim et al. 2012; Mendes et al. 2003; Sahena et al. 2009*).

Utilizar el agua debajo de su temperatura crítica conservándola aún en estado líquido es otra propuesta utilizada para la extracción de aceites, a dicha temperatura el agua se hace menos polar lo que le permite disolver el contenido celular, al enfriarse vuelve a ser inmisible al aceite lo que favorece la separación (*Ayala y Castro 2001*). Dentro de sus principales ventajas, se encuentran: tiempos reducidos de extracción, alta calidad de productos, bajos costos como solvente, compatibilidad ambiental, se elimina la etapa de separación de agua y secado (*Herrero, Cifuentes, y Ibanez 2006*), está limitado al diseño de unidades a gran escala y de los sistemas de enfriamiento rápido (*de Boer et al. 2012; Cooney et al. 2009*).

1.8.4.1.3 Métodos Biológicos

El uso de enzimas para degradar la célula microalgal, es una metodología sugerida para la extracción de aceites. Existen diferentes tipos de enzimas todas ellas capaces de degradar enlaces específicos, a pesar de alcanzar buenas eficiencias el costo de las enzimas así como su reutilización y tiempo de reacción aún son una limitante (*Gerken et al. 2013*;

Zheng et al. 2011; Zheng et al. 2016). Algunos experimentos en bacterias y levaduras han producido excreciones de ácidos grasos, sin embargo los rendimientos son bajos y aún no son factibles económicamente (Greenwell et al. 2010; Kleinig y Middelberg 1998; Steen et al. 2010).

En la Tabla 11, se muestran algunos rendimientos de extracción de aceite, así como las diferentes metodologías y condiciones para la obtención de aceite de microalga. Cabe mencionar que la tabla presenta en su mayoría métodos combinados con el objetivo de aumentar las eficiencias de extracción.

Tabla 11. Rendimiento de extracción lipídica y eficiencias de algunos métodos de extracción para diferentes especies de microalga.

Especie	Método de Extracción	Condiciones	Rendimiento lipídico %	Eficiencia	Referencia
Botryococcus braunii	Mezcla de solventes	Cloroformo-metanol (75% v/v de metanol)	19.2	-	(Hidalgo et al. 2016)
	Mezcla de solventes	Éter de petróleo-metanol (75% v/v de metanol)	18.90	-	
Chlorella sp. KR-1	Química	Persulfato de potasio 2mM / 90°C	-	95%	(Seo et al. 2016)
	Química	Peróxido de hidrógeno 0.5% /90°C	-	80%	
Chlorella pyrenoidosa	Solventes / Mecánica	Etanol / 30°C / 600 kPa	11.3	72%	(Batista et al. 2016)
Chlorella sp. KR-1	Solventes / Luz UV	UV-reacción similar a Fenton /0.5% H ₂ O ₂ / luz UV de 16 W	-	87%	(Seo et al. 2015)
Tetraselmis sp.	Solventes / Microondas	Método Hara and Radin + MW a 65 °C por 5 min	8.19	-	(Teo y Idris 2014)
Nannochloropsis sp.	Solventes / Microondas	Método Folch et al. + MW a 65 °C por 5 min	8.47	-	
Chlorella vulgaris	Solventes / Microondas	Soxhlet, cloroformo: metanol (2:1), 8 (h). MW 15 min a 100 °C	22.68	-	(Sharma et al. 2016)
Chlorella vulgaris	Hidrólisis enzimática / solventes	2% (v/v) Celluclast 1.5 L ay 1% (v/v) Novozyme 188 ,72 (h). cloroformo: metanol = 2:1 (v/v)	~10%	-	(Cho et al. 2013)
Scenedesmus sp.	Dióxido de Carbono supercrítico (SC-CO ₂)	53 °C, 500 bar y 1.9 g min ⁻¹	7.41	-	(Taher et al. 2014)
Chlorella vulgaris	Solvente-Ultrasonido	Método Bligh and Dyer, baño ultrasónico 40 kHz, intensidad de 29.7 W L ⁻¹	52.5	-	(Araujo et al. 2013)
Chlorella vulgaris	Electroporación	pulsos 21 × 100 µs, 4 kV ,10 Hz	22	-	(Flisar et al. 2014)

1.8.4.2 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas formadas por cadenas de carbono que tienen un grupo funcional carboxilo. Los ácidos grasos más comunes son los que tienen cadenas de carbono entre 4 y 22 ($C_4 - C_{22}$) unidades, siendo C_{18} el más frecuente de estos. A pesar de conocerse alrededor de 1000 ácidos grasos, son 20 los más abundantes en la naturaleza. De estos, el ácido palmítico, oleico y linoléico componen alrededor del 80% de los aceites y grasas (Gordon 2006). En la tabla siguiente, Tabla 12, se enlista una serie de ácidos grasos con sus distintas nomenclaturas. Usualmente se utilizan un número separado de otro por dos puntos, el primero se refiere al número de carbonos o tamaño de la cadena y el segundo describe el número de dobles enlaces. Por ejemplo, el ácido palmítico (16:0) que contiene 16 carbonos con ningún enlace doble, lo que le otorga su naturaleza de ácido graso saturado. También se añaden prefijo como *cis* (*Z*) o *trans* (*E*) para describir la geometría de los enlaces de carbono.

Tabla 12. Ácidos grasos más comunes. Adaptado de (Gordon 2006).

Nombre Común	Nombre corto	Nomenclatura Química (ácido)	Estructura
Butírico	4:0	butanoico	$C_4H_8O_2$
Caproico	6:0	hexanoico	$C_6H_{12}O_2$
Caprílico	8:0	octanoico	$C_8H_{16}O_2$
Cáprico	10:0	decanoico	$C_{10}H_{20}O_2$
Láurico	12:0	Dodecanoico	$C_{12}H_{24}O_2$
Mirístico	14:0	Tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$
Palmítico	16:0	hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$
Palmitoleico	16:1	9-hexadecenoico	$C_{16}H_{30}O_2$
Esteárico	18:0	octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$
Oleico	18:1	9-octadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$
Ricinoleico	18:1	12-hidroxi-9-octadecenoico	$C_{18}H_{34}O_3$
Vaccénico	18:1	11-octadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleico	18:2	9,12-octadecadienoico	$C_{18}H_{32}O_2$
Alfa-Linolénico (ALA)	18:3	9,12,15-octadecatrienoico	$C_{18}H_{30}O_2$
Gamma-Linolénico (GLA)	18:3	6,9,12-octadecatrienoico	$C_{18}H_{30}O_2$
Araquídico	20:0	eicosanoico	$C_{20}H_{40}O_2$
Gadoleico	20:1	9-eicosenoico	$C_{20}H_{38}O_2$
Araquidónico (AA)	20:4	5,8,11,14-eicosatetraenoico	$C_{20}H_{32}O_2$
EPA	20:5	5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	$C_{20}H_{30}O_2$

Behénico	22:0	docosanoico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Erucico	22:1	13-docosenoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
DHA	22:6	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
Lignocerico	24:0	tetracosanoico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Nervónico	24:1	15, tetracosenoico	C ₂₄ H ₄₆ O ₂

Las microalgas pueden producir una gran variedad de lípidos que pueden ser utilizados ya sea para la industria alimenticia o para la producción de biodiesel. Para el último caso, Los ácidos grasos que son preferibles son los de cadenas entre 14 y 18 carbonos. Siendo los más importantes para la calidad del biodiesel los ácidos saturados C₁₄, C₁₆ y C₁₈ y de los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, C16:1, C16:2, C18:1 y C18:2 (*Schenk et al. 2008*). Los ácidos grasos insaturados que contengan 3 o 4 dobles enlaces reducen la estabilidad de biodiesel al almacenarse. Dichos ácidos grasos con más de 3 dobles enlaces tales como los omega-3 o los omega-6 pueden ser utilizados como alimento o suplemento alimenticio. Actualmente estos metabolitos son de gran importancia en términos de productividad y sustentabilidad ya que pueden competir con los contenidos de aceites de pescado (*Adarme-Vega et al. 2014*). La siguiente tabla muestra el perfil de los diferentes ácidos grasos para algunas especies reportadas de microalgas, comparándolos con aceites comestibles típicos.

Tabla 13. Perfil de ácidos grasos para distintas especies de microalgas. Adaptada de (*Talebi et al. 2013*).

Especie / Porcentaje de AG	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	AGS	AGI	AGP
Ankistrodesmus sp.	16.24 ± 0.5	3.06 ± 0.8	7.18 ± 0.7	17.66 ± 0.8	8.48 ± 0.8	28.68 ± 0.5	2.55 ± 0.1	23.43	23.27	37.16
Chlamydomonas reinhardtii	23.77 ± 0.9	1.94 ± 0.6	4.41 ± 2.5	19.73 ± 0.6	6.58 ± 0.9	25.49 ± 0.9	1.21 ± 0.1	28.18	22.88	32.07
Dunaliella sp.	9.19 ± 1.5	0.80 ± 0.3	4.27 ± 1.2	22.51 ± 0.7	3.84 ± 0.5	44.31 ± 2.4	1.42 ± 0.3	13.47	24.74	48.15
Dunaliella salina	12.02 ± 1.5	4.45 ± 0.2	1.90 ± 0.6	23.67 ± 2.1	2.28 ± 0.6	40.36 ± 1.9	1.40 ± 0.1	13.93	29.52	42.65
Dunaliella salina (UTEX)	16.33 ± 0.4	1.03 ± 0.2	6.43 ± 0.7	19.57 ± 1.1	6.76 ± 2.5	27.70 ± 2.1	2.28 ± 0.8	22.77	22.89	34.47
Scenedesmus sp.	15.62 ± 0.5	4.06 ± 0.7	2.97 ± 0.9	15.23 ± 0.8	7.00 ± 0.9	22.99 ± 0.5	7.49 ± 2.2	18.59	26.86	30
Chlorella emersonii	14.75 ± 0.6	–	9.80 ± 0.9	17.01 ± 0.3	9.04 ± 1.5	29.32 ± 1.5	2.74 ± 1.4	24.55	17.01	38.37
Chlorella protothecoides	16.15 ± 0.8	–	6.63 ± 1.4	19.23 ± 0.6	7.02 ± 0.4	29.17 ± 1.9	2.35 ± 0.9	22.79	19.23	36.19
Chlorella salina	21.50 ± 0.8	2.62 ± 1.3	7.83 ± 0.7	14.39 ± 0.5	10.88 ± 0.7	29.75 ± 1.1	1.50 ± 0.5	29.34	18.52	40.63
Chlorella vulgaris	14.55 ± 0.9	1.183 ± 2.5	10.51 ± 1.6	23.62 ± 1.9	13.80 ± 0.5	32.10 ± 1.7	–	25.06	24.8	45.9
Amphora sp.	28.61 ± 1.1	38.16 ± 0.9	12.66 ± 2.3	–	3.86 ± 1.5	4.55 ± 0.5	–	41.28	38.16	8.42

Soya	11	–	4	24	53	8	–	15	24	61
Canola	4	–	2	61	19	10	–	6	61	29

AG, ácido graso; AGS, ácido graso saturado; AGI ácido graso insaturado; AGP ácidos graso poliinsaturado

1.9 Bioremediación ambiental con microalgas

1.9.1 Aguas Residuales

Las aguas residuales y los lixiviados producto de la descomposición de los residuos orgánicos, son contaminantes que dañan los cuerpos de agua y el suelo. Por otro lado, se ha demostrado que las microalgas, microorganismos fotosintéticos que habitan en cuerpos acuáticos y que tienen la capacidad de reproducirse celularmente más rápido que las plantas, pueden remover nutrientes del agua o de otro medio de cultivo (Rodríguez-Palacio y Vázquez-Perales 2012).

El agua residual doméstica se origina en instalaciones sanitarias, en comercios, instituciones y casas principalmente. Contienen esencialmente materia orgánica en forma de proteínas y carbohidratos, microorganismos, nitrógeno y fósforo; mientras que la composición del agua residual industrial depende del tipo de industria de la que provenga y los materiales que procesan, por lo que pueden contener desde compuestos orgánicos fácilmente biodegradables hasta compuestos tóxicos como metales pesados. Las aguas residuales municipales corresponden a aquellas manejadas en los sistemas de alcantarillado municipales urbanos y rurales (Comisión Nacional del Agua 2012).

Dentro de estos contaminantes, la materia orgánica y los nutrientes son los de mayor relevancia en el tratamiento de aguas residuales municipales; ya que cuando estas aguas son descargadas en un cuerpo receptor causan eutrofización en el ecosistema.

El nitrógeno (N) y el fósforo (P) son los principales causantes de la eutrofización en los cuerpos de agua, causando el crecimiento acelerado de microalgas, y bacterias, que puede producir la muerte de peces al despojarlos del oxígeno que necesitan para vivir (Valencia 2012).

Las fuentes de nitrógeno en el agua residual pueden ser tanto naturales (precipitaciones, polvo, escorrentía rural y fijación biológica) como artificiales (industrias, abonados, filtración de fosas sépticas). El nitrógeno total presente en las aguas residuales puede clasificarse en tres grupos: amoniacal, oxidado y orgánico. De todas estas formas, las que tienen una mayor importancia desde el punto de vista de la depuración de aguas son el nitrógeno amoniacal y el orgánico (Valencia 2012).

Por otro lado, el fósforo también es un elemento esencial en el crecimiento de algas y otros organismos biológicos, proviene principalmente de los desechos humanos, actividades industriales, detergentes sintéticos y productos de limpieza. Las formas comunes de fósforo en soluciones acuosas incluyen ortofosfatos, polifosfatos y fosfatos orgánicos; los ortofosfatos están disponibles directamente para el metabolismo biológico, no así los polifosfatos que después de una hidrólisis son convertidos a ortofosfatos asimilables como nutrientes, el fósforo orgánico está asociado a residuos de origen tanto animal como alimenticio (*Olmos et al. 2003; Siles 2008*).

1.9.2 Lixiviados orgánicos

Un lixiviado puede resultar de la mezcla de agua de lluvia con residuos orgánicos, o puede ser el agua producida a partir de la biodegradación de los desechos y el agua inherente de dichos residuos (*Zhang et al. 2013*).

Los lixiviados contienen toda característica de un contaminante, es decir, alto contenido de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, presencia abundante de patógenos e igualmente de sustancias tóxicas como metales pesados.

A pesar de que los lixiviados son contaminantes potenciales, éstos pueden ser considerados una fuente de nutrientes y agua. Debido a ello, muchos lixiviados provenientes de residuos orgánicos son utilizados como fertilizantes, ya que contiene carbono, nitrógeno, fósforo, potasio y elementos traza que pueden ser utilizados por las plantas (*Romero et al. 2013*).

Por lo mismo, se han utilizado lixiviados de gallinaza como medio de cultivo en la producción de biomasa microalgal; aunque el principal problema es el efecto inhibitor de los contaminantes tóxicos que se generan en el lixiviado concentrado. Por lo cual, éste siempre es llevado a una segunda fermentación o diluido con agua potable.

1.9.3 Tratamiento de efluentes residuales con microalgas

Como ya se mencionó, los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales y uso de lixiviados orgánicos resultan un dilema al querer combinar eficiencia con bajo costo, por lo que es necesario buscar e implementar alternativas económicamente viables que mejoren la calidad de los efluentes residuales.

Una alternativa al uso de procesos convencionales es la biorremediación, la cual consiste en la aplicación de procesos biológicos para el tratamiento de ambientes contaminados, de modo que se cumpla con los límites establecidos en la normatividad.

Un tipo de biorremediación, que ha llamado la atención desde hace varios años es la ficorremediación de efluentes residuales. Ésta puede ser definida como: el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO₂ presentes en un agua residual (Valencia 2012).

Se han realizado estudios utilizando lixiviados como medio de *cultivo*, (Ortiz-Moreno *et al.* 2012) utilizaron lixiviado de gallinaza, obteniendo resultados favorables para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Este estudio menciona que los lixiviados tienen como ventaja sus bajos costos y alta disponibilidad, pero requieren de un manejo adecuado para evitar procesos de descomposición bacteriana que generen productos tóxicos para las algas, así como riesgos sanitarios. El mismo estudio menciona también que los estiércoles suelen tener compuestos tóxicos para las microalgas, y que una alternativa para evitarlo es la digestión, ya sea anaerobia o aerobia, lo que permite disminuir la demanda biológica de oxígeno (DBO) del estiércol líquido y su contenido de amonio, además de estabilizar su pH, siendo éstas condiciones indispensables para el desarrollado adecuado de las microalgas.

Richards *et al.* utilizaron lixiviados provenientes de rellenos sanitarios municipales observando que después de un periodo de 10 días las microalgas, *Nanochloropsis*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis chunii* y *Chaetoceros muelleri*, removieron alrededor del 95 % de metales pesados del medio (Richards y Mullins 2013). Señalando que el estudio basado en microalgas es un método de bioremediación que supone la viabilidad para el tratamiento de efluentes residuales

2

MATERIALES Y MÉTODOS

- Selección de la especie
- Condiciones de cultivo
- Determinaciones físicas
- Determinaciones analíticas



Capítulo II

2. Materiales y Métodos

2.1 Selección de especie

2.1.1 Aislamiento

La especie *Verrucodesmus verrucosus* pertenece a la colección de cultivos del Laboratorio de Ficología Aplicada UAMI (Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa), fue colectada en una zona de lagos temporales en Ciudad Azteca, Estado de México. Se aisló por la técnica de aislamiento con micropipeta de punta adelgazada (Arredondo-Vega y Voltolina 2007). La célula se mantuvo en una cámara de cultivo Nuaire en medio F2 (Guillard y Ryther 1962) con un fotoperiodo de 12:12. Para la identificación se trabajó con microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía de luz (Cambra Sánchez 1998; Fanés Treviño et al. 2009; Hegewald et al. 2013; John et al. 2002).

2.1.2 Morfología

Verrucodesmus verrucosus está compuesta por cenobios (agrupación o colonia de células) mayormente formados por dos hileras de células densamente apretadas, frecuentemente dispuestas en diferentes planos sin dejar espacios entre ellas. Estas células irregularmente ovadas, están ligeramente aplanadas en sus sitios de unión. Las células internas se superponen unas con otras, las dos células externas más o menos reniformes, están situadas entre las dos hileras de células. La pared celular está cubierta por hileras de verrugas que a veces son visibles sólo en los polos libres de las células. Los cenobios de esta especie pueden contener de 4 a 8 células. Las dimensiones celulares son menores de 10 μm , normalmente entre 4 y 7 μm (Cambra Sánchez 1998; Fanés Treviño et al. 2009; Hegewald et al. 2013; John et al. 2002). Ver Fig. 29.

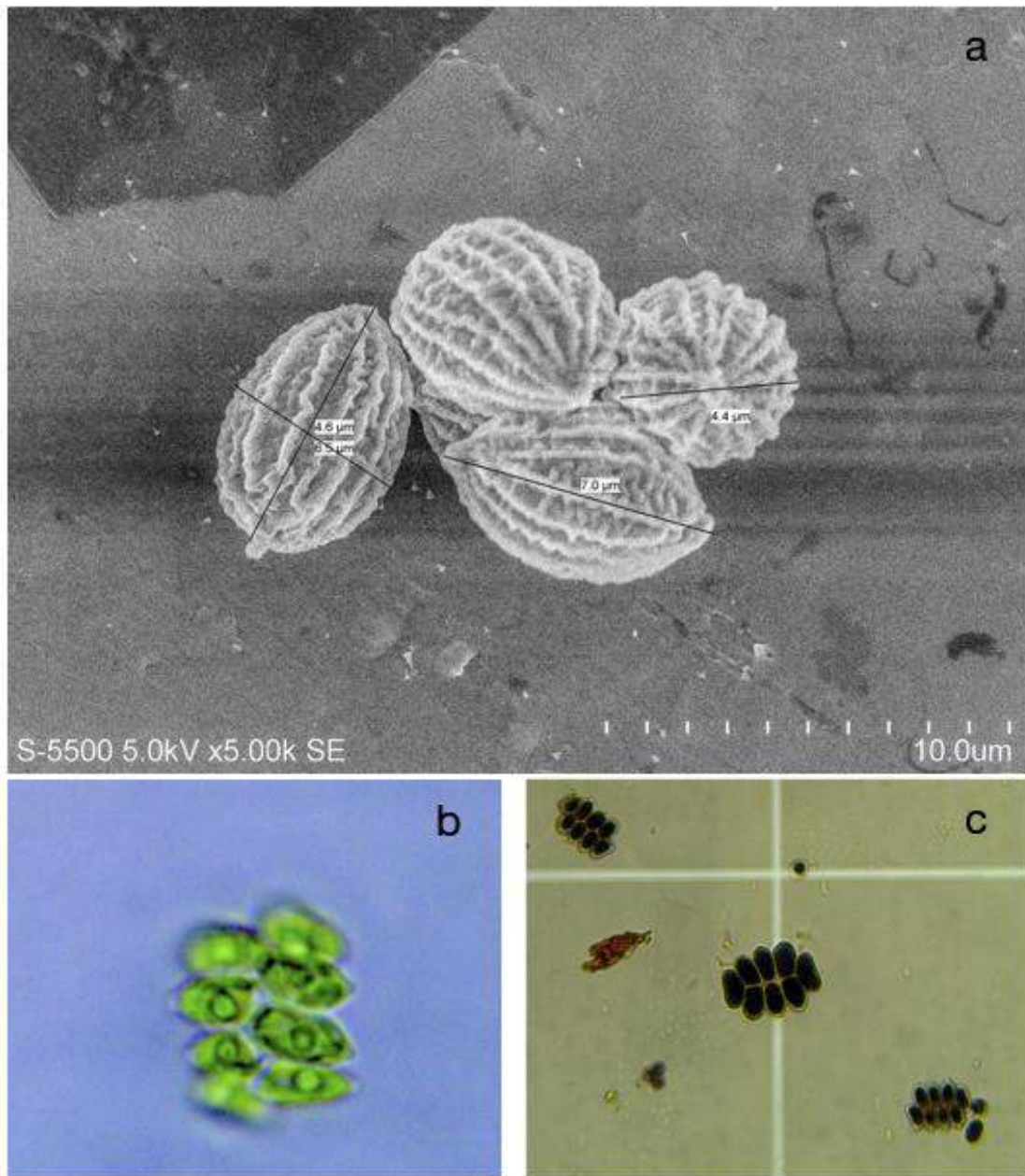


Fig. 29. La especie *Verrucodesmus verrucosus*. a) Microscopio de barrido electrónico, b) Microscopio de luz, c) Lugol como fijador para conteo celular

2.2 Condiciones de cultivo

Se utilizaron como medios de cultivo, lixiviados de lombriz, excretas de borrego y de elefante; agua residual municipal y como medio de control el fertilizante foliar Bayfolan Forte. El lixiviado de lombricomposta proviene de un proceso de composteo de basura orgánica con lombriz roja de california, se utilizaron 5 mL de lixiviado en un litro de agua. Los lixiviados de borrego y de elefante se prepararon utilizando 1g de excremento seco por 100 mL de agua. Se dejaron fermentar 7 días, luego se separaron los lixiviados, de los cuales se utilizaron 5 mL de lixiviado en un litro de agua. Por otro lado, el agua residual se tomó directamente de la planta de tratamiento de aguas residuales del tipo reactor anaerobio de flujo descendente (UASB por sus siglas en inglés Upflow Anaerobic Sludge Blanket) de la UAM Iztapalapa. Los lixiviados y el agua residual se sometieron a un pretratamiento con luz UV durante 48 horas para minimizar la carga bacteriana. Como medio de control se utilizó el fertilizante foliar Bayfolan forte de Bayer a una concentración de 1mL L⁻¹.

2.2.1 Escalado en 150 mL

Las condiciones experimentales se llevaron a cabo en dos fases, la primera fue en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Los medios de cultivo con lixiviados se prepararon a una concentración de 5 mL L⁻¹, el agua residual sin ninguna dilución y 1mL L⁻¹ para el medio de control. Se utilizaron 100 mL de cada medio de cultivo por 10 mL de inóculo (*Verrucodesmus verrucosus*). Las muestras se analizaron por triplicado bajo condiciones de luz de 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodo de 12:12, temperatura del medio de 22°C +/- 1 °C. La duración del muestreo y de los análisis fue de 60 días, ver Fig. 30. El objetivo de esta primera fase fue comparar la cinética de crecimiento y determinar en cuál de los medios hubo mayor remoción, tanto de amonio como de ortofosfatos al inicio y al final del experimento.



Fig.30. Escalado en 150 mL para la especie *V. verrucosus*

2.2.2 Escalado en 10 y 16 L

En la segunda etapa se seleccionaron únicamente tres medios de cultivo con base en las mejores condiciones del primer experimento. Se utilizó el lixiviado de borrego, el agua residual y el medio de control (Bayfolan forte de Bayer®). Las concentraciones fueron las mismas que las de la fase uno, únicamente el volumen de trabajo cambió, 10 L para el agua residual y 16 L para el lixiviado de borrego y el medio de control. Los biorreactores utilizados fueron de vidrio, cilíndricos y con un volumen total de 20 L. Para el caso del agua residual fueron de plástico con un volumen total de 10L. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, excepto para el medio de control, ya que en experimentos anteriores se observó su reproducibilidad. Se inoculó el 10% (v v⁻¹) de la especie para cada reactor. Las condiciones de luz y temperatura se mantuvieron igual que en la fase anterior. Los reactores se alimentaron con aire del medio ambiente mediante burbujeo a una tasa de 0.6 vvm (volumen de aire por volumen total del bioreactor por minuto). El tiempo de muestreo fue de 51 días, ver Fig.31.

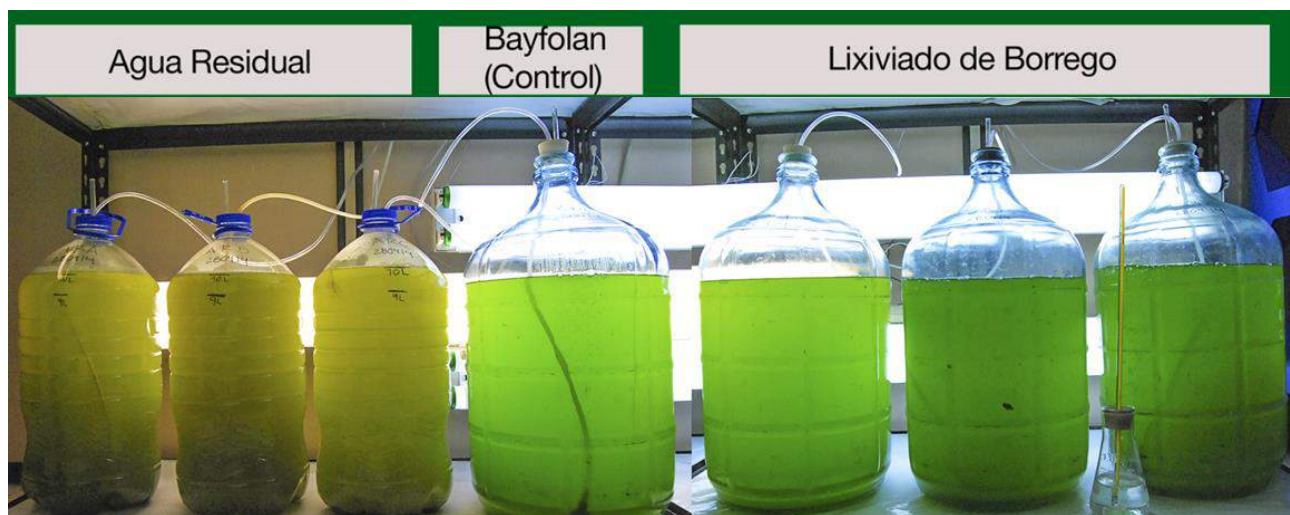


Fig.31. Escalado en 10 y 16 L para la especie *V. verrucosus*.

2.3 Determinaciones físicas

2.3.1 Conteo Celular

El conteo celular para ambas fases se llevó a cabo cada tercer día. Para el escalado en 150 mL, se obtuvo 1mL de cada reactor y cada muestra se fijó con acetato de Lugol. El recuento se llevó a cabo con una cámara llamada hematocitómetro (Cámara de Neubauer), la cual tiene 0.1mm de profundidad y una regilla con nueve cuadrados de 1mm por cada lado, cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 μ L, ver Fig.32., (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

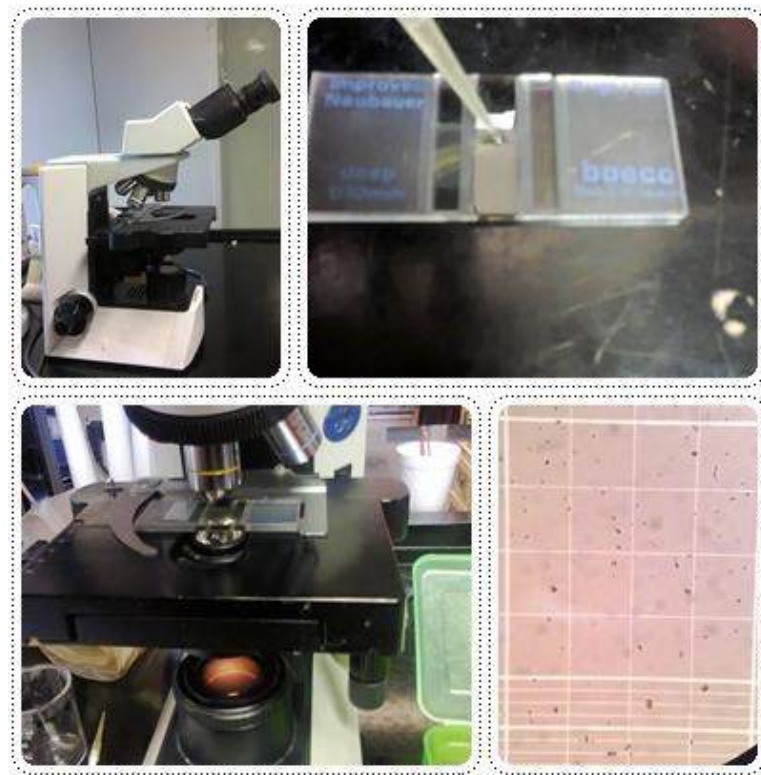


Fig.32. Conteo celular mediante cámara Neubauer

2.3.2 Ecuaciones de crecimiento celular

La tasa de crecimiento específico se determinó mediante la siguiente ecuación (Andersen 2005):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t_2 - t_1}$$

Donde:

μ es la tasa de crecimiento específico en (días⁻¹)

N_t y N_0 son concentraciones celulares en lapsos determinados del crecimiento (células mL⁻¹)

t_2 y t_1 momentos finales e iniciales en cualquier intervalo de crecimiento (días)

A partir de la tasa de crecimiento específico se puede determinar las divisiones por día (k), dividiendo μ entre el logaritmo de dos, mediante la siguiente ecuación:

$$k = \frac{\mu}{0.6931}$$

El tiempo de duplicación es el inverso de (k), con la siguiente ecuación:

$$td = \frac{0.6931}{\mu}$$

2.3.2 Cosecha y Secado

Para conocer el rendimiento de los reactores a 10 y 20 L se determinó la cantidad de biomasa microalgal al final del experimento para cada uno de los medios de cultivo. Una vez concluida esta etapa, se detuvo la aireación de los reactores, dejándolos 24 horas para que la microalga sedimentara. Se retiró el sobrenadante hasta separar la biomasa húmeda en tubos Falcon de 50 mL. Se centrifugó la biomasa a 5000 rpm (Centurion Scientific K241R) por 15 minutos a una temperatura de 4°C, ver Fig.33. Se retiró el sobrenadante para posteriormente congelar la biomasa a -30°C. Después de 48 horas, la biomasa se secó en un liofilizador (FreeZone 6 Liter Benchtop Freeze Dry System) por 24 horas a una temperatura del colector de -50°C y una presión de 0.133 mbar, ver Fig.34.

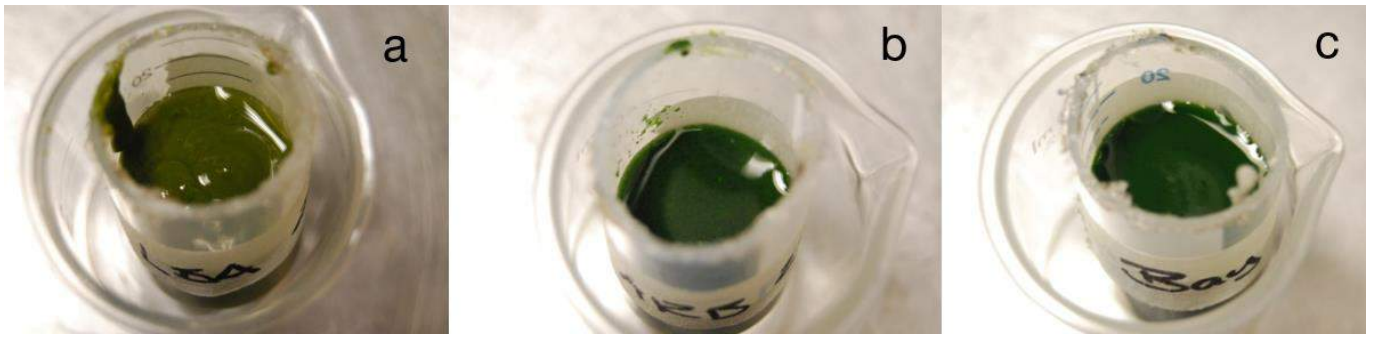


Fig.33 Biomasa húmeda después del proceso de sedimentación, a) lixiviado de borrego, b) agua residual, c) medio de control.



Fig.34. Biomasa seca microalgal.

2.3.3 Determinación de peso seco

Cada muestra de biomasa se pesó sobre papel filtro y después se llevó a un horno de extracción a una temperatura de 85°C por 24 horas. Las muestras se depositaron en un desecador conectado a una bomba de vacío hasta alcanzar temperatura ambiente. Cada una se retiró del desecador y se pesó hasta obtener una lectura de peso seco constante.

$$P_s = P_f - F$$

Donde:

P_s es igual al peso de la biomasa seca.

P_f es igual al peso del filtro más el peso de la biomasa húmeda.

F es el peso inicial del filtro.

2.4 Determinaciones analíticas

2.4.1 Determinación de pigmentos

La determinación de pigmentos se llevó a cabo mediante la extracción metanólica de la biomasa por 24 horas, las muestra se midieron en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10 UV-VIS) utilizando las ecuaciones propuestas por (*Marker et al. 1980*) para la clorofila a y por (*Strickland y Parsons 1972*).

Se tomaron 2 mL de cultivo de cada muestra y se centrifugaron por 10 min a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de metanol puro. Se homogenizó por vortex durante 1 min. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se refrigeraron por 24h. Se centrifugaron las muestras y el sobrenadante se llevó hasta el volumen apropiado para las celdas del espectrofotómetro (2.5 mL), ver Fig.35. Se midió el extracto en espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 480 y 665 nm para carotenoides totales y clorofila a respectivamente. Se utilizaron las ecuaciones propuestas para determinar la concentración.

Clorofila a ($\mu\text{g mL}^{-1}$): $Abs_{665} \times 13.15$

Carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$): $Abs_{480} \times 4$



Fig.35. Extracción de Pigmentos (Clorofila a y Carotenoides).

2.4.2 Determinación de lípidos totales

La extracción de lípidos, se realizó mediante la metodología de (*Bligh y Dyer 1959*) adaptada para la extracción en microalgas. Y la cuantificación de dichos lípidos totales se llevó a cabo con el método de (*Marsh y Weinstein 1966*).

Para la extracción de lípidos se pesaron 2 tubos de vidrio de 15 mL para cada muestra, uno que contenía 5 mg y otro con 50 mg de biomasa de microalga seca. Se añadieron 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2) sin agua. Con base en el 1% de lípidos esperado, dependiendo del tipo de microalga (*Arredondo-Vega y Voltolina 2007*), se añade butilhidroxitolueno (BHT) disuelto en cloroformo (1mg mL^{-1}), para este caso se añadieron 2mL y 0.2mL (para el tubo con menor y mayor biomasa, respectivamente). Se sonicó (equipo Branson 5800 Cleaner) por 15 minutos (3 ciclos) en un baño de hielo y agua. Los tubos se incubaron 24h a 4°C protegidos de la luz. Se repitieron los ciclos y condiciones del sonicado anterior. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min a 5°C , donde se recuperó el extracto con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo de vidrio de 10 mL. A la biomasa residual se le agregó 1.5 mL de una mezcla de cloroformo-metanol, $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 20 min a 5°C , recuperando el extracto. Al tubo del extracto se le añadieron 2 mL de agua destilada y rápidamente se colocó en el vortex por alrededor de un segundo para evitar emulsión y se eliminó el exceso de agua de la capa superior. Se separó la fase inferior formada por cloroformo y lípidos, ver Fig.36. En la campana de extracción, se secó la mezcla solvente-lípido con nitrógeno gaseoso. Se procedió a la cuantificación de lípidos.

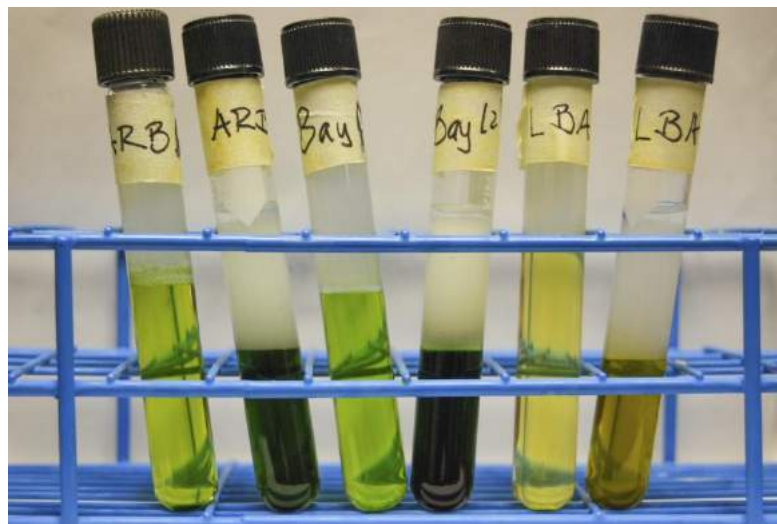


Fig.36. Extracción de lípidos totales.

El método más sencillo es el propuesto por (Marsh y Weinstein 1966), dicha técnica tiene la ventaja de tener una alta reproducibilidad y la utilización de un reactivo simple y estable como el ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.

El método consiste en resuspender los lípidos totales en 1 mL de cloroformo y pasar una alícuota de 100 μ L a otro tubo. Las muestras se evaporan con nitrógeno gaseoso hasta secar completamente. Se agregaron 2 mL de H_2SO_4 concentrado. Se taparon y cubrieron los tubos con papel aluminio. Dichos tubos se calentaron a 200 ± 2 °C en estufa por 15 min, se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó en espectrofotómetro a 375 nm. Los tubos se colocaron en un baño de agua con hielo durante 5 min. Después se agregaron 3 mL de agua destilada y se mezcló en el vortex hasta que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica, ver Fig.37. Se dio la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 375 nm, calibrando el equipo con un blanco de H_2SO_4 que se trata de igual manera que las muestras.

Para calcular el porcentaje de lípidos se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times [(A / FC) \text{ Ve} / (P)]$$

A = Absorbancia a 375 nm

FC = Factor de corrección o pendiente de la curva de calibración.

Ve = Volumen del extracto (mL)

P = Peso de la muestra (mg)

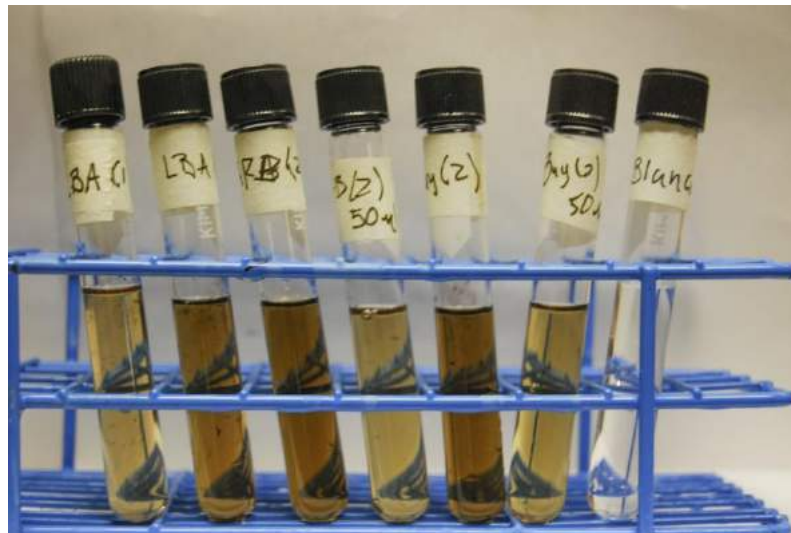


Fig.37. Cuantificación de lípidos totales por espectrofotometría.

Como referencia, se realizó una curva de calibración de lípidos. En donde se prepararon soluciones de una mezcla de lípidos de concentración conocida de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La pendiente depende del peso molecular de los lípidos, para este caso se utilizó como referencia, para los triglicéridos, triestearina, para los esteroides se utilizó colesterol y para los fosfolípidos, la fosfatidilserina. La siguiente gráfica es una curva de absorbancia y concentración a partir de soluciones de concentración conocida, ver Fig.38. Lo anterior, sirve para interpolar la absorbancia de muestras de concentración desconocida. La operación se realiza mediante el cálculo de una regresión lineal simple entre las concentraciones y las absorbancias de las diluciones (mínimos cuadrados) donde:

$$\text{Concentración} = \text{Absorbancia} \cdot a + b$$

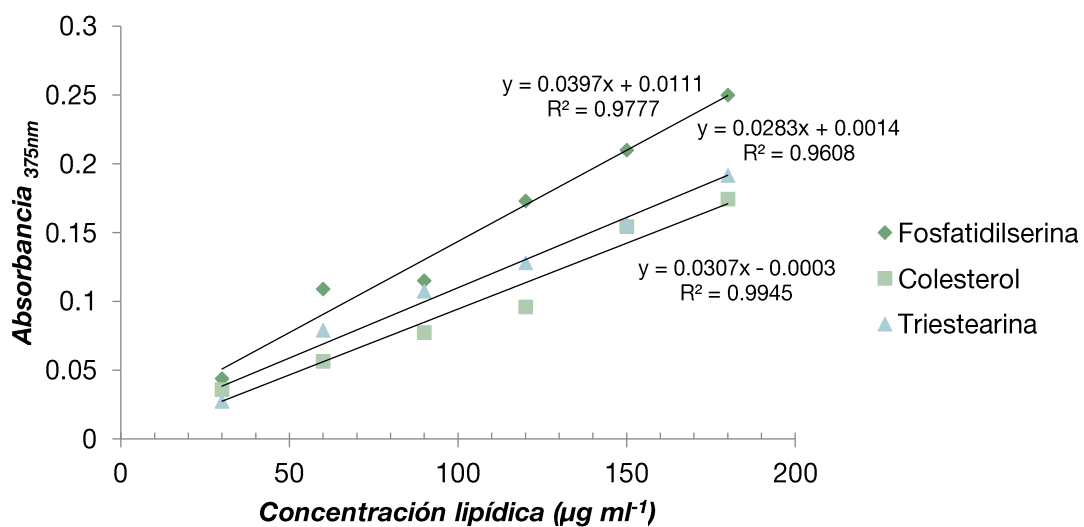


Fig.38. Curva de calibración para la cuantificación de lípidos totales.

2.4.3 Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se llevó a cabo mediante el aparato Soxhlet. La biomasa seca de cada una de las muestras se introdujo en un cartucho de celulosa cubierta con algodón dentro del equipo. Se añadieron 200 mL de hexano y se calentó a 80 °C durante 24 horas en recirculación. Después de este tiempo se recuperó el hexano en un rotavapor (Buchi R-215) a una temperatura de 80°C a 65 rpm, ver Fig.39. La fracción lipídica junto con hexano se almacenó en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente pesado y llevado a peso constante (como en el apartado 2.3.2). El hexano remanente se evaporó en una campana de extracción a 80°C durante 2h. Una vez retirado el hexano de la muestra, los lípidos fueron determinados gravimétricamente por diferencia de pesos entre el tubo vacío y el tubo con lípidos extraídos.



Fig.39. Extracción de lípidos neutros vía Soxhlet y recuperación del solvente.

2.4.4 Análisis cualitativo de la biomasa mediante FTIR

Se tomaron 15 mg de biomasa seca de cada una de las muestras. El análisis FTIR se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer FTIR System, equipado con un detector mercurio-cadmio-telurio, ver Fig.40. El espectro fue registrado en el software Spectrum GX en un rango de número de onda entre 4000-650 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . Bajo la modalidad de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés, Attenuated Total Reflectance). Cada muestra fue analizada por triplicado.



Fig.40. Equipo para el análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Las bandas de cada uno de los espectros fueron identificadas en relación a la información publicada para microalgas, ver Tabla 14.

Tabla14.Principales bandas de absorción de microalgas en el infrarrojo. Adaptada de (Mayers, Flynn, y Shields 2013).

Número de onda (cm^{-1})	Asignación de Banda	Grupos Funcionales
3400-3200	$\nu\text{O-H}/\nu\text{N-H}$	Agua, proteína
2960	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$	CH_3 grupo metilo
2930	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	CH_2 grupo metileno
2850	$\nu\text{CH}_2, \nu\text{CH}_3$	CH_2 y CH_3 grupos metilo y metileno
1745	$\nu\text{C=O}$	Ésteres de lípidos ácidos grasos
1655	$\nu\text{C=O}$	Proteína (Amida I)
1545	$\delta\text{N-H}, \nu\text{C-N}$	Proteína (Amida II)
1455	$\delta_{\text{as}}\text{CH}_2, \delta_{\text{as}}\text{CH}_3$	CH_2 y CH_3 grupos metilo y metileno
1390	$\delta_{\text{s}}\text{CH}_2, \text{CH}_3/\delta\text{C-O}$	CH_2 y CH_3 of proteínas/grupos carboxílicos
1240	$\nu_{\text{as}}\text{P=O}$	Fosfodiéster de ácidos nucleicos y fosfolípidos
1200-900	$\nu\text{C-O-C}$	Polisacáridos/ siloxano
1075 and 950	$\nu\text{Si-O}$	Siloxano, silicato, frústulos
980-940	P-O-P	Polifosfatos

ν = tensión simétrica y ν_{as} =tensión asimétrica, δ = flexión simétrica, δ_{as} =flexión asimétrica.

2.4.5 Perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases y masas

La cromatografía se llevó a cabo en Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM). El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases 6890 acoplado a un espectrómetro de masas 5973N marca Agilent, ver Fig. 41. Se utilizó electroionización (EI) a 70 eV. La columna capilar utilizada fue una HP 5MS con dimensiones de 30m x 0.250mm x 0.25 μ m. Como gas acarreador se utilizó He. La temperatura inicial del horno fue de 45 °C mientras que la del inyector fue de 250 °C y 280 °C en la columna. El espectrómetro de masas asociado al cromatógrafo de gases fue un MSD (Mass Selective Detector). Se mezclaron 500 μ L de diclorometano con el extracto, de los cuales, 1 μ L de ésta mezcla se inyectó al cromatógrafo. Los espectros de masa y los tiempos de retención se compararon con la base de datos de la biblioteca NIST (versión 1.7a) para identificar los componentes presentes y así determinar su concentración.



Fig.41. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas.

2.4.6 Análisis de remoción de nutrientes

Para el análisis de la segunda etapa, se obtuvieron 15 mL cada tercer día para cada uno de los reactores. Siguiendo la metodología propuesta por (Koroleff 1983) para la determinación de amonio y para la determinación de ortofosfatos se utilizó la metodología propuesta por la (EPA - Environmental Protection Agency 1978).

2.4.6.1 Determinación de Amonio (NH_4)

El método consiste en la reacción del amonio con el fenol, favorecido por el ion hipoclorito en condiciones alcalinas, en donde las posibles formaciones de amoniaco por pH son desfavorables y, por el contrario, las de amonio son favorables. El nitroprusiato de sodio funciona como catalizador que favorece la intensidad del color en la reacción. La cual está directamente relacionada con la concentración de amonio en el medio de cultivo, ver Fig. 42.

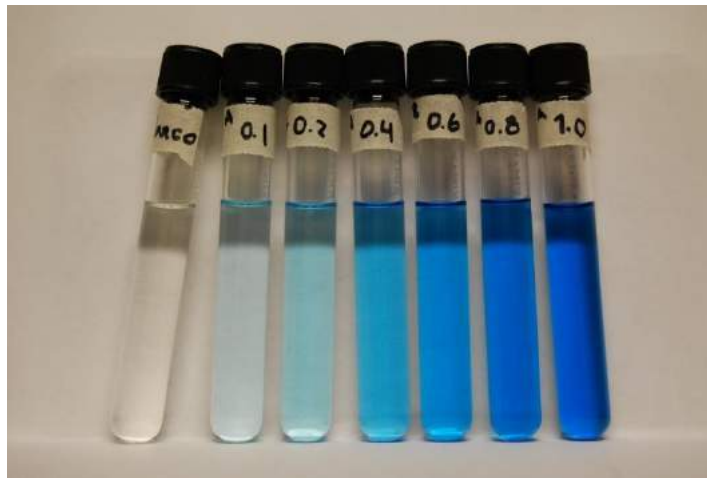


Fig.42. Muestras de referencia para la determinación de Amonio en los medios de cultivo.

La preparación de los reactivos se hizo de la siguiente manera:

- I. Solución de Fenol: pesar 50 g de Fenol (C_6H_5OH) y aforar a 500 mL con alcohol etílico.
- II. Solución de nitroprusiato: disolver 1 g de nitroprusiato de Sodio ($Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$) en 200 mL de agua.
- III. Reactivo alcalino: 100 g de citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7$) y 5 g de hidróxido de sodio ($NaOH$) se disuelven en 500 mL de agua.
- IV. Solución oxidante fresca: 10 mL reactivo alcalino + 3mL hipoclorito

Enseguida, se dio inicio al tratamiento de las muestras:

Se transfirió cada una de las muestras a tubos de vidrio de 10 mL, centrifugadas a 5000 rpm por 20 min. Se descartó el sobrenadante considerando la posible carga de NH_4 . Para este caso, se realizó una dilución de 1:50 para las muestras de agua residual y para el medio de control, debido a su alta carga de amonio. Para el caso de los lixiviados de borrego únicamente se realizó una dilución de 1:5, luego se agregaron 5 mL del sobrenadante de cada muestra en tubos de vidrio de 10 mL. A cada tubo se le dio un tratamiento como lo muestra la Tabla 15. Al tubo de referencia se le agregaron únicamente 5 mL de agua destilada y se realizó el mismo tratamiento que los demás tubos. Finalizado el proceso, se agitaron los tubos y se dejaron incubar durante 2 h en completa oscuridad. Cubierto este tiempo, se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. Para después calcular con base en una curva estándar, las concentraciones de amonio en cada uno de los medios de cultivo.

Para realizar la curva estándar, se preparan dos soluciones, la primera nombrada “patrón I”, en la cual se disuelven 0.3666 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agua destilada, se afora a 100 mL, esta solución tendrá una concentración de 1 g de $\text{NH}_4 \text{ L}^{-1}$. La solución nombrada “patrón II” se compone de 0.5 mL de la solución “patrón I” aforada a 100 mL, teniendo una concentración final de 5 mg de $\text{NH}_4 \text{ L}^{-1}$. Se realizó la siguiente tabla para la curva estándar, ver Fig. 43.

Tabla 15. Concentraciones de referencia para generar la curva estándar (Análisis de Amonio).

Concentración (mg L^{-1}) 1)	Patrón II (mL)	H_2O (mL)	Tratamiento
0.1	0.1	4.9	
0.2	0.2	4.8	0.2 mL fenol + 0.2
0.4	0.4	4.6	mL nitroprusiato +
0.6	0.6	4.4	0.5 mL solución
0.8	0.8	4.2	oxidante → leer a 640
1.0	1.0	4.0	nm

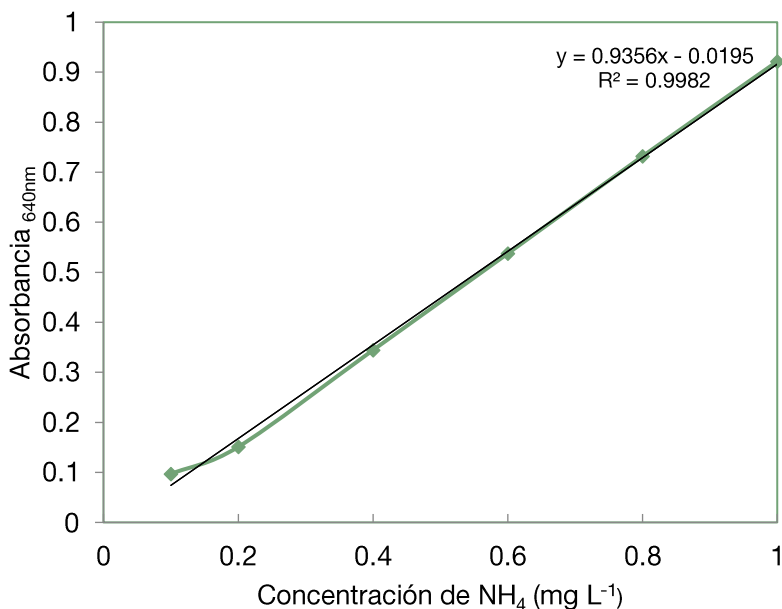


Fig.43. Curva de calibración para la determinación de la concentración de amonio.

2.4.6.2 Determinación de Ortofosfatos (PO_4)

Se llevó a cabo bajo el método del ácido ascórbico, que utiliza el molibdato de amonio y el tartrato de antimonil potásico para reaccionar, en un medio ácido, con los ortofosfatos

del medio y así formar un ácido fosfomolibdico reducido por el ácido ascórbico, lo que da como resultado una solución azul intensa (azul de molibdeno). Este color al igual que la prueba de amonio es linealmente dependiente de la concentración de PO_4 en el medio, ver Fig.44.

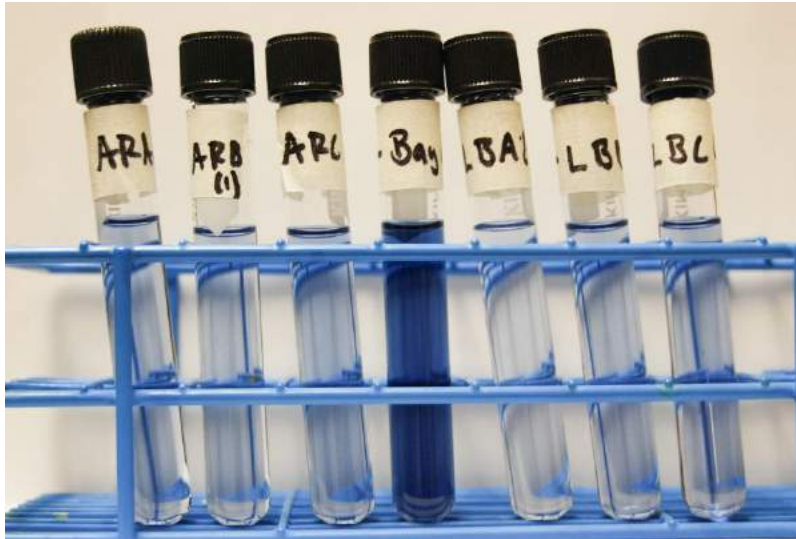


Fig.44. Método de ácido ascórbico para la determinación del Ortofosfatos en los medios de cultivo.

La preparación de los reactivos se hizo de la siguiente manera:

- I. Solución de ácido sulfúrico 5N: se disolvieron 14 mL de H_2SO_4 concentrado en H_2O destilada y se aforó 100 mL.
- II. Solución de tartrato de antimonil potásico: se disolvieron 0.2743 g de tartrato de antimonil potásico $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, y se aforó a 100 mL.
- III. Solución de molibdato de amonio: se disolvieron 4 g de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y se aforó a 100 mL.
- IV. Solución de ácido ascórbico 0.1M: se disolvieron 1.76 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada.

Tabla.16 Composición para 10 mL de la mezcla de reactivos (Análisis de Ortofosfatos).

Reactivo	Cantidad (mL)
Ácido Sulfúrico	5
Tartrato antimonil potásico	0.5
Molibdato de amonio	1.5
Ácido ascórbico	3
Mezcla	10

Una vez preparada la mezcla de los reactivos, se transfirieron cada una de las muestras a tubos de vidrio de 10 mL. Se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min. Se descartó el sobrenadante considerando la posible carga de PO_4 , para este caso, se realizó una dilución de 1:10 para todas las muestras de cultivo. Se agregaron a cada tubo 5 mL de muestra (sobrenadante) y 0.8 mL de la mezcla de reactivos, como lo muestra la Tabla 16. Al tubo de referencia o se le agregaron únicamente 5 mL de agua destilada y 0.8 mL de la mezcla de reactivos. Se agitaron los tubos y se dejaron reposar por 15 min para después dar lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 880 nm.

La curva estándar se realizó con dos soluciones de referencia. La primera, nombrada "Patrón I" se elaboró diluyendo 0.816g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en agua destilada hasta aforar a 250 mL. Esta solución tendrá una concentración de $569.5 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$. Para la solución nombrada "patrón II", se tomó un volumen de 1.75 mL de la Solución "Patrón I" y se aforó a 100 mL, se tendrá una concentración final de $10 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$. Se realizó la siguiente tabla para la curva estándar, ver Tabla 17 y Fig. 45.

Tabla 17. Concentraciones de referencia para generar la curva estándar (Análisis de Ortofosfatos).

Concentración (mg L^{-1})	Patrón II (mL)	H_2O (mL)	Tratamiento
1.0	0.5	4.5	
2.0	1.0	4.0	0.8 mL mezcla de reactivos + 15 min reacción → leer 880 nm
3.0	1.5	3.5	
4.0	2.0	3.0	
5.0	2.5	2.5	
0	0	5.0	

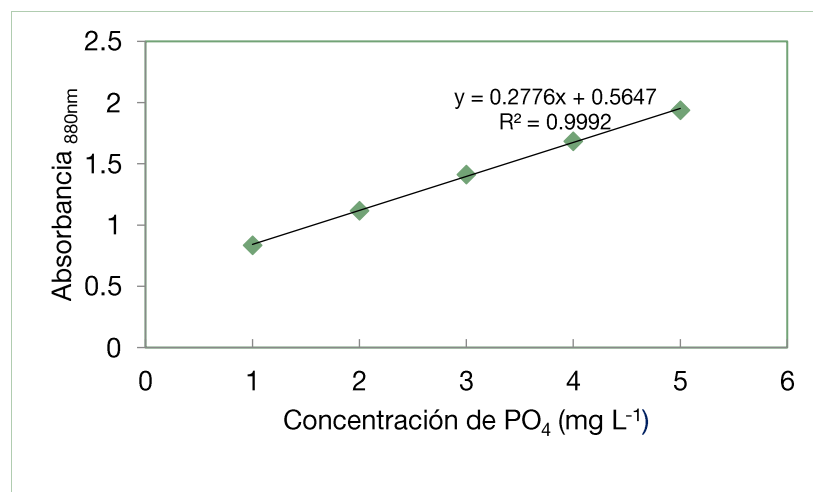
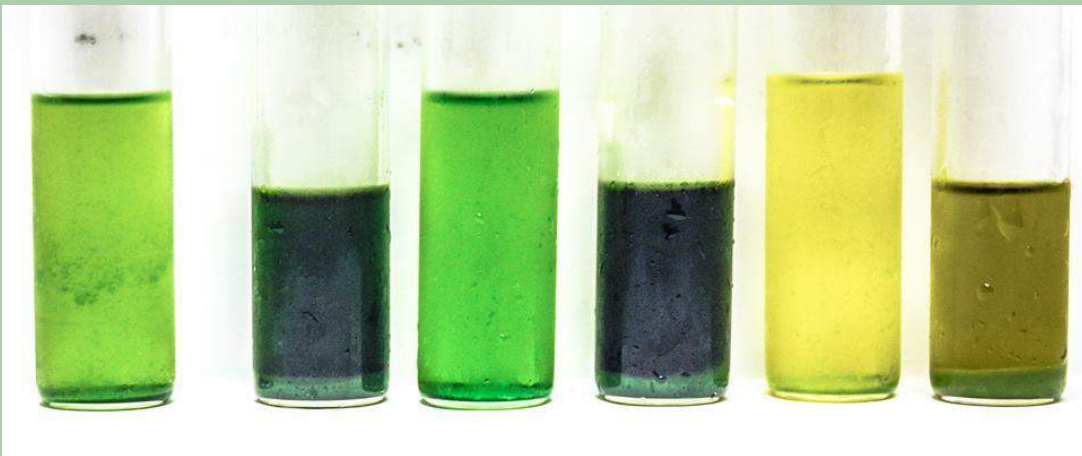


Fig.45. Curva de calibración para la determinación de la concentración de ortofosfatos.

3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Evaluación de la cinética de crecimiento
- Evaluación de los rendimientos de la producción de biomasa
- Análisis de la calidad de la biomasa con base al contenido de pigmentos
- Evaluación de la remoción de Amonio y Ortofosfatos
- Análisis del contenido de lípidos de la biomasa
- Análisis del extracto de lípidos contenidos en la biomasa



Capítulo III

3. Resultados y discusión

3.1 Evaluación de la cinética de crecimiento

3.1.1 Crecimiento y análisis en 150 mL

Los objetivos principales en el estudio de cinéticas de crecimiento es demostrar qué tratamiento genera la mayor concentración de biomasa, y la determinación del tiempo adecuado para su cosecha. Una forma sencilla para poder determinar el final y el inicio de cada fase de crecimiento es mediante la suma progresiva del crecimiento específico diario y así poder observar el cambio de velocidad de duplicación. La gráfica de la figura 46. muestra el cambio de la pendiente de la tasa de crecimiento, indicando el cambio de fases del cultivo. Por ejemplo, entre los primeros 10 días, el cultivo llega a su fase de desaceleración debido a que los nutrientes comienzan a agotarse.

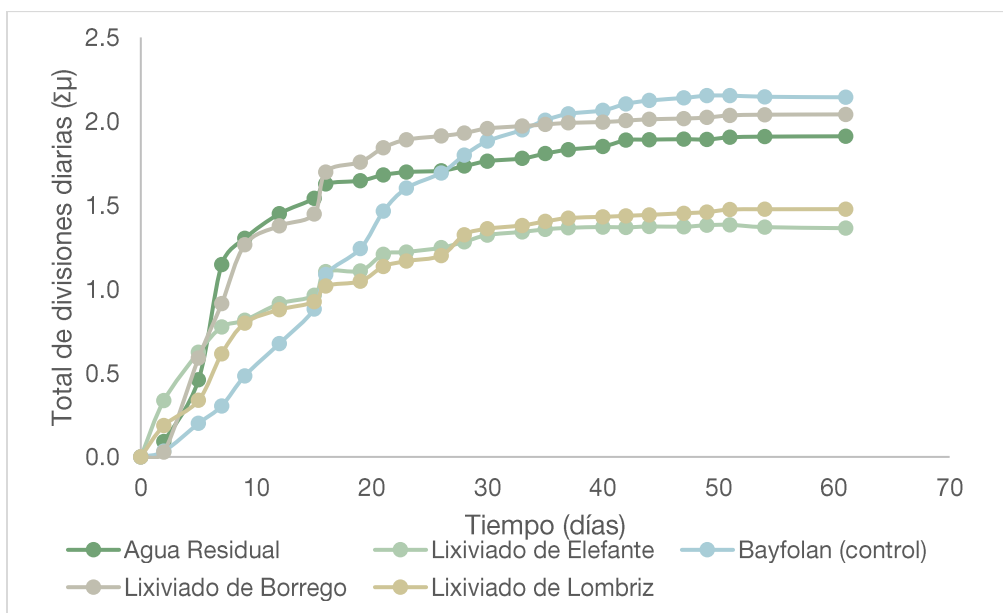


Fig.46. Suma progresiva de duplicaciones de *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo.

Entre los criterios de selección para los futuros escalados se tomaron en cuenta factores como, el crecimiento específico poblacional, sobre todo en la fase exponencial. El cual está directamente relacionado con el número de divisiones celulares diarias, así como con el tiempo que tardaría en duplicarse la biomasa a la velocidad de crecimiento dada.

Como se muestra en la Tabla 18, Los tres medios más destacados para la siguiente fase fueron el agua residual, el lixiviado de borrego y el medio de control.

Tabla 18. Valores de crecimiento. Tasa de crecimiento específico μ , Divisiones por día (k) y tiempo de duplicación (150 mL)

Medio de Cultivo	Tasa de Crecimiento Específico, μ_{max} (día⁻¹)	Divisiones por día, k	Tiempo de duplicación, td (día)
Agua Residual	0.69	0.99	1.01
Lixiviado de Elefante	0.29	0.42	2.40
Bayfolan (Control)	0.22	0.32	3.11
Lixiviado de Borrego	0.35	0.51	1.98
Lixiviado de Lombriz	0.28	0.40	2.51

Valores obtenidos entre el comienzo y el final de la fase exponencial.

En la Fig.47, se puede observar el crecimiento de la especie de trabajo en cinco medios alternativos de cultivo. Los medios que tuvieron un mayor crecimiento celular fueron, el medio de control y el agua residual con un promedio de $14 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en 42 días, mientras que el lixiviado de elefante únicamente produjo $9 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$, aunque en un tiempo menor (32 días). El lixiviado de borrego y el lixiviado de lombriz tuvieron una producción celular de $12 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en 40 días. El medio de control comenzó la fase exponencial aproximadamente a los 20 días de iniciado el experimento esto puede deberse a que el medio de cultivo en donde se inoculó la especie era el mismo ,prolongando la fase lag (Votolina et al. 1998). Por el contrario, el lixiviado de elefante tuvo una rápida respuesta para la fase exponencial. Sin embargo, detuvo el crecimiento debido a un posible agotamiento de nitrógeno o de la fuente de carbono. El crecimiento en al agua residual, lixiviado de borrego y de la vermicomposta tuvieron una adaptación rápida al medio, además de alcanzar niveles de producción de biomasa cercanas al medio de control aún bajo concentraciones iniciales de amonio y fosfatos muy inferiores a este último.

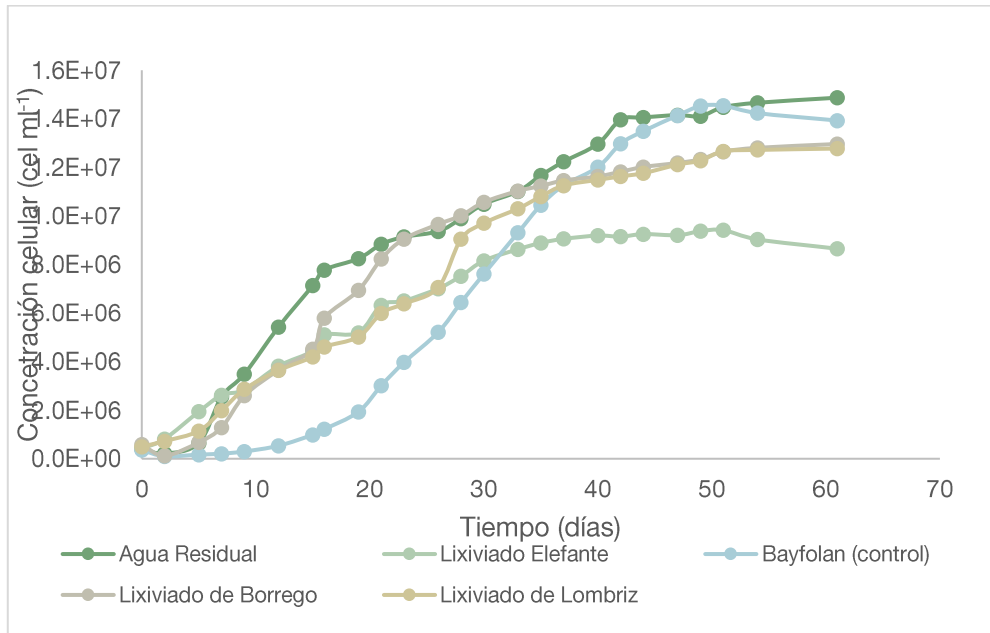


Fig.47. Cinética de crecimiento para la especie *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo para un volumen de 150 mL

Crecimientos celulares similares fueron mostrados en estudios realizados por V. Duong con la especie *Scenedesmus dimorphus* en un medio de cultivo convencional (BBM Medio Basal Bold) con una concentración final de $14.59 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y una velocidad específica de $0.41 \mu (\text{día}^{-1})$ (Duong et al. 2015). A su vez, Andrade et al. con la especie *Scenedesmus* lograron concentraciones de $8.05 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en experimentos al exterior con un volumen de 150 L en tanques abiertos utilizando como medio de cultivo una mezcla de agua potable con agua residual de pescadería (Andrade et al. 2009). Chacón et al., utilizaron agua residual filtrada proveniente de lagunas facultativas obteniendo una densidad celular de $9.35 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ con el alga *Scenedesmus* sp. (Chacón et al. 2004). Con la especie *Desmodesmus spinosus* se alcanzaron concentraciones cercanas a $14 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en el medio de cultivo TAP (Tris-Acetate-Phosphate por sus siglas en inglés) utilizado para especies que utilicen el amonio como fuente nitrógeno en lugar de nitratos (Valdez-Ojeda et al. 2015).

3.1.2 Crecimiento y análisis para el escalado en 16y 10 litros

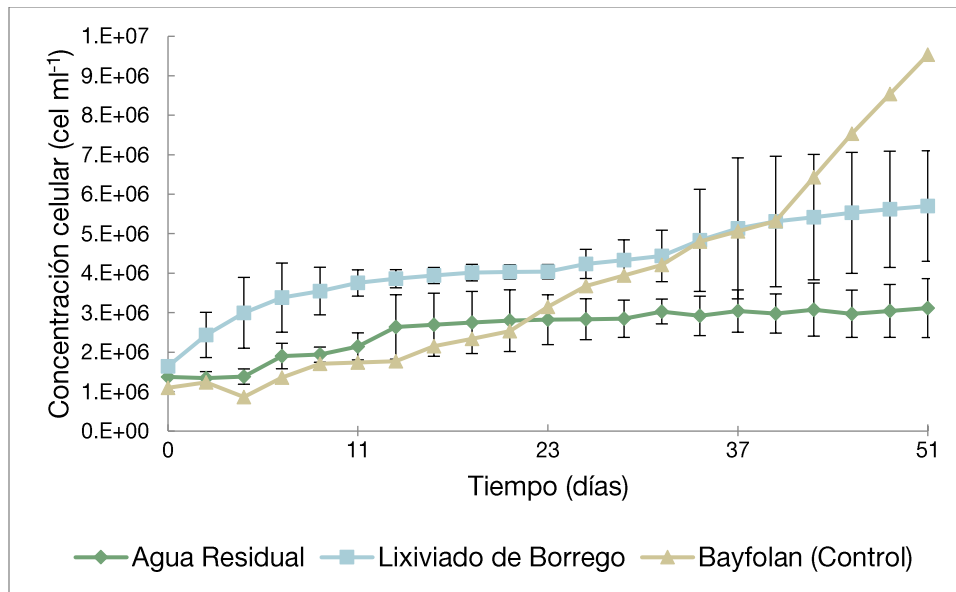


Fig. 48. Cinética de crecimiento para la especie *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo para un volumen de 10 y 16 L.

En esta fase se seleccionaron tres medios de cultivo, el lixiviado de borrego, el agua residual y el medio de control (Bayfoland forte). En la figura 48, se observa la cinética de crecimiento durante un periodo de 51 días, se alcanzó un máximo de crecimiento para la fase estacionaria de $9 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ para el medio de control (Bayfoland), $3 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ para el agua residual y $5 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ para el lixiviado de borrego. Al comparar los experimentos de las fases uno y dos, se observa que la densidad celular alcanzó valores mucho menores a los de la primera etapa. Esto puede deberse a aspectos como la adición de un sistema de aireación o la baja intensidad de luz que pudo resultar de aumentar el volumen de escalado provocando sombreado en altas densidades de cultivo (Anón 2009).

V. Duong et al. obtuvieron crecimientos celulares del orden de $4.69 \text{ E}^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y una velocidad específica de $0.48 \mu (\text{día}^{-1})$ (Duong et al. 2015) en medio de cultivo BBM. Song et al. utilizaron la especie *Scenedesmus* SDEC-8 en un medio de cultivo de agua residual artificial logrando un concentración celular de $2.5 \text{ E}^6 \text{ cel ml}^{-1}$ y una tasa de crecimiento específico de $0.37 \mu (\text{día}^{-1})$ (Song et al. 2014).

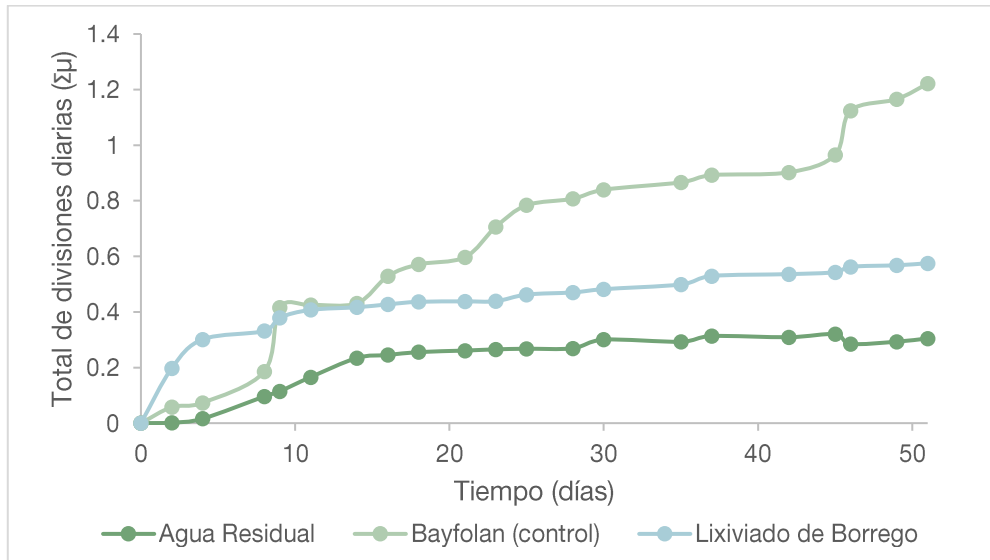


Fig.49. Suma progresiva de duplicaciones de *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo en 10 y 16L.

La figura anterior, Fig.49., relacionada a la suma de las velocidades específicas. Puede observarse que la especie en el lixiviado de borrego tuvo un rápido crecimiento en los primeros 4 días de cultivo, seguidos de un crecimiento más lento durante toda su cinética. Mientras que el agua residual alcanzó su fase de desaceleración a los 14 días. Diferente a esto, el medio de control se mantuvo en crecimiento, hasta los 22 días donde las células se reprodujeron a tasas muy pequeñas, aumentando de nuevo en los últimos cinco días del experimento.

Tabla 19. Valores de crecimiento. Tasa de crecimiento específico μ , Divisiones por día (k) y tiempo de duplicación (10 y 16 L).

Medio de Cultivo	Tasa de Crecimiento Específico, μ_{max} ($día^{-1}$)	Divisiones por día, k	Tiempo de duplicación, td (día)
Agua Residual	0.08	0.12	8.66
Bayfolan (Control)	0.23	0.33	3.02
Lixiviado de Borrego	0.10	0.15	6.68

Otra manera de analizar el crecimiento fue mediante las ecuaciones de crecimiento celular (Sección 2.3.1.1). En la tabla 19, se puede observar la tasa de crecimiento específico dada en un intervalo de tiempo durante la fase de crecimiento exponencial y con relación a ella se obtuvo el número de divisiones diarias y el tiempo de duplicación.

Los lixiviados, en general, son un residuo de la descomposición de la materia orgánica. De ser utilizado y tratado, evitaría contaminación de suelo y agua, principalmente. Aunque también del aire, debido a las emisiones de metano a la atmósfera que genera la descomposición anaerobia. El reto de tratamiento de los lixiviados se debe a su complejidad en composición ya que esta puede ser muy variable no sólo debido al tipo de fuente (rellenos sanitarios, agricultura, ganadería, desechos de alimentos y procesos de compostaje y vermicompostaje, por mencionar algunos) sino también al tiempo en que estos se generan. Los componentes principales de la mayoría de los lixiviados son nitrógeno amoniacal, fosfatos, sustancias húmicas, metales pesados y algunos fenoles. Los lixiviados frescos, generalmente contienen altos niveles de amonio y materia orgánica biodegradable, mientras que los más viejos tienen menor carga de amonio quedando en su mayoría materia orgánica no biodegradable (Huo et al. 2008).

Se debe puntualizar que las condiciones y especies de trabajo son diferentes y dado que la especie *Verrucodesmus verrucosus* es una especie que no ha sido reportada en la literatura para trabajos biotecnológicos ni de biorremediación se puede comparar sólo con especies de la misma familia Scenedesmaceae de los géneros *Scenedesmus* y *Desmodesmus*.

El tratamiento de aguas residuales es una manera importante de reducir los contaminantes presentes en dichas aguas. Sin embargo, aún después de los tratamientos biológicos para el control de microorganismos, el efluente aún cuenta con cantidades considerables de nutrientes (nitrógeno y fósforo, principalmente) y de ser descargados a los cuerpos de agua puede causar eutrofización y daños al ecosistema. Los resultados de esta tesis y otros estudios han demostrado la capacidad de las microalgas para remover contaminantes de las aguas residuales y otros efluentes. Siendo un sistema más económico de remoción y a su vez de producción de biomasa (Sriram y Seenivasan 2012). Wang et al. obtuvieron valores de tasas de crecimiento específico entre 0.34 y 0.95 (día⁻¹) para el concentrado de agua residual después de la etapa de sedimentación de lodos, como en este trabajo (Wang et al. 2010). Este efluente puede utilizarse crudo o también puede esterilizarse para eliminar cualquier patógeno o competencia microbiana, ya sea mediante luz UV o en autoclave. En un estudio realizado por Y. Li et al. (Li et al. 2011) se obtuvieron tasas de crecimiento específico para la fase exponencial de 0.48 y 0.68 (día⁻¹) para el concentrado de agua

residual en autoclave y crudo respectivamente. Para este estudio se obtuvieron tasas máximas de crecimiento de 0.69 y 0.08 (día⁻¹) para 150 mL y 10 L respectivamente.

Martínez *et al.*, reportaron con la especie *Scenedesmus obliquus* en medios de cultivo provenientes de extracto de suelo y agua residual sintética con una producción de biomasa máxima y crecimiento específico de 72 y 85 mg L⁻¹, 0.16 y 0.33 d⁻¹ respectivamente (Martínez, Cruz, y Pellón A. 2010), demostrando una mejor adaptación al agua residual sintética, con velocidades de producción de biomasa mayores y tiempos de duplicación más cortos. En otro reporte en donde se utilizaron residuos de citrato industrial, caracterizando por sus altos contenidos de CNPK, se incubó el alga verde *Scenedesmus* sp. en 2L de cultivo con 10 mL de ácido cítrico de desecho, logrando tasas de crecimiento específico de 0.29 d⁻¹ dentro de un periodo de 10 días. El crecimiento tan rápido en este medio lo atribuyen al contenido inicial de macro y micronutrientes especialmente carbón y nitrógeno (El-Sayed 2010). Toyub *et al.* estudiaron la especie *Scenedesmus obliquus* en diferentes concentraciones de agua proveniente de la industria de dulces comparándola con un medio típico en el cultivo de algas (Medio Basal Bold). Obtuvieron tasas de crecimiento específico entre 0.32 y 0.38 d⁻¹, comprado con 0.42 del medio de control. Demostrando que, con concentraciones relativamente bajas, 2.5% , se puede utilizar un medio de desecho como cultivo de microalgas y suplir medios de cultivo que pueden ser costosos e inviábiles a gran escala (Toyub *et al.* 2012). Algunas otras tasas de crecimiento específico similares se obtuvieron en trabajos utilizando agua residual sintética durante 30 días con la especie *Scenedesmus rubescens*, con velocidades de 0.0314 μ (día⁻¹) y 0.16 μ (día⁻¹) para la especie *Scenedesmus quadricauda* (Aravantinou *et al* 2013; Han *et al.* 2014). Así como de 0.37 μ (día⁻¹) para la especie *Scenedesmus* sp. LX1 en el medio BG-11 modificado con un crecimiento celular de 0.85 E6 cel mL⁻¹, 0.12 μ (día⁻¹) para la especie *Scenedesmus dimorphus* en medio de cultivo "Chlorella", 0.34 μ (día⁻¹) para la especie *Scenedesmus obliquus* y 0.38 μ (día⁻¹) para *Scenedesmus* sp. en medios convencionales BG11 y BBM respectivamente (Mandal y Mallick 2009; Ruangsomboon *et al.* 2013; Wu y Miao 2014a; Xin *et al.* 2011). Es importante observar que, si bien los resultados de este estudio son, en algunos casos, superiores a los de algunos autores y en algunos casos inferiores se debe a los diversos efectos de los medios de cultivo, así como los parámetros de crecimiento. Por mencionar algunos de los reportados: el volumen cambia desde 200mL hasta 2 L. Algunos de ellos alimentados con aire, la mayoría en matraces Erlenmeyer de vidrio algunos con botellas plásticas, ciclo de luz de 12:12 o 14:10, intensidad luminosa entre 60 a 200 μmol m⁻² s⁻¹ y temperaturas entre 25 y 30 °C.

3.2 Evaluación de los rendimientos de producción de biomasa

Contar con la mayor cantidad de biomasa es uno de los grandes retos para el proceso de cultivo de microalgas. Como puede observarse en la Tabla 20, el reactor que obtuvo mayor cantidad de biomasa por unidad de volumen, fue el medio de control seguido del agua residual y el lixiviado respectivamente. A pesar de estos resultados para lograr esta cantidad de biomasa se tendría que esperar demasiados días en el reactor, si es que en los siguientes escalados a mayor volumen se comportara igual la especie. Para este caso es mejor cosechar en el día 14 que es donde la mayoría de los medios ya alcanzaron su fase estacionaria y no esperar hasta el día 51 donde prácticamente la concentración celular no cambia excepto, como ya se mencionó, para el medio de control.

Tabla 20. Rendimiento de producción de biomasa de la especie *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Rendimiento del Reactor (g L⁻¹)
Agua Residual	0.3497
Bayfolan (Control)	0.771
Lixiviado de Borrego	0.4935

Los rendimientos de biomasa son muy variados en la literatura, ya que existen diferentes variables que están ligadas con el crecimiento celular. En primer lugar, la especie. Pueden ser especies locales, como en este caso, especies de colecciones internacionales o hasta especies genéticamente modificadas. Otro aspecto importante son las características de medio de cultivo, como son: artificial, comercial, natural, efluentes de agua residual etc..) y el tercer aspecto lo representan las condiciones de cultivo : tipo de cultivo (autótrofo, heterotrófico, mixotrófico), el tipo de luz (artificial o natural) , ciclo de luz , intensidad de luz, volumen del reactor, tipo de reactor , transferencia de masa (agitación, gasificación, de gasificación), la temperatura , el pH, concentración de CO₂ y concentración de O₂. En la siguiente tabla, Tabla 21, se muestra una comparativa con otros estudios, así como algunas de las condiciones de cultivo.

Tabla 21. Comparativa con otros estudios para los rendimientos de producción de biomasa para algunas especies de la familia *Scenedesmaceae*

Medio de Cultivo	Especie	Volumen (L)	Fotoperiodo (h)	Temperatura (°C)	Intensidad ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Rendimiento del Reactor (g L^{-1})	Referencia
MBB y residuos de comida	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.3	16:08	27	120	0.41	(Ji et al. 2015)
AR artificial	<i>Scenedesmus</i> SDEC-8	0.5	-	25	40	0.80	(Song et al. 2014)
AR artificial	<i>S. quadricauda</i> SDEC-1	1	-	25	4000 lux	0.46	(Han et al. 2014)
DG suero de queso y excreta de ganado	<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	-	0.22	(Franchino et al. 2013)
AR pescadería	<i>Scenedesmus</i> sp.	150	12:12	30	natural	0.37	(Andrade et al. 2009)
AR tratada-granja lechera	<i>Scenedesmus</i> sp.	600	12:12	27-32	120	0.208	(Hena et al. 2015)
AR cruda	<i>Desmodesmus</i> sp.	20	12:12	-	-	0.58	(Komolafe et al. 2014)
DG. granja porcina	<i>Desmodesmus</i> sp. EJ9-6	0.05	15:9	24	120	0.412	(Ji et al. 2014)
Excreta de cerdo	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1	12:12	20	228	~0.5	(de la Noüe 1989)
AR tratada	<i>Scenedesmus acutus</i>	1	12:12	27	-	~0.7	(Sacristán de Alva et al. 2013)
AR acuicultura	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.5	16:08	25	120	1.25	(Ansari et al. 2017)

MBB, Medio Basal Bold; AR, Agua Residual; DG, Digestato

3.3 Análisis de la calidad de la biomasa con base a su contenido de pigmentos

El valor máximo de clorofila para la fase uno, se dio en el medio de control con $1.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ seguido del agua residual y el lixiviado de lombriz, ambos con valores cercanos a $0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$. La producción de clorofila para el caso del segundo escalado fue similar, Los valores máximos de producción de clorofila se dieron al principio del muestreo para el caso del lixiviado de borrego con una concentración inicial de $1.09 \mu\text{g mL}^{-1}$ y a los 16 días para el agua residual y el medio de control ($2.13 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $2.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente), ver Fig.50. Chacón et al. obtuvieron una concentración de clorofila y carotenoides totales de $9.52 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $5.40 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, utilizando la especie *Scenedesmus* sp. en agua

residual únicamente filtrada. Lo que sugiere una relación directa entre el contenido de nutrientes esenciales y la acumulación de clorofilas (Chacón et al. 2004) . En otros experimentos utilizando agua residual obtenida de una planta de tratamiento después del tratamiento con lodos activados observaron una concentración mayor de clorofila en comparación con agua residual antes de la etapa de lodos activados de alrededor de 12 mg mL⁻¹ y 5 mg mL⁻¹ respectivamente, demostrando que un tratamiento terciario con microalgas es más factible que un tratamiento primario o secundario (Hena et al. 2015).

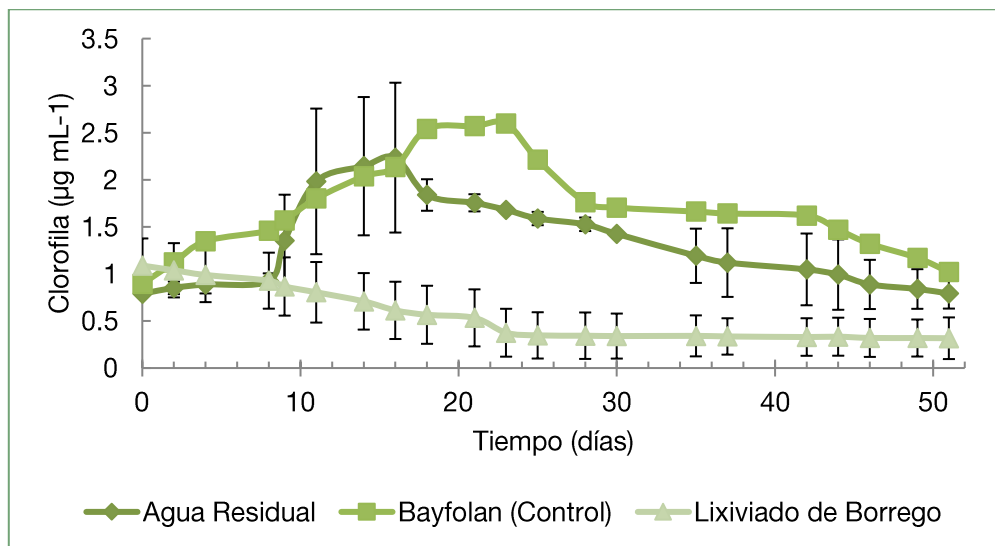


Fig.50. Producción de *Clorofila a* para la especie *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo

El valor máximo de carotenoides totales para la primera fase se dio en el medio de control con 0.97 µg mL⁻¹ seguido del agua residual con una producción de 0.8 µg mL⁻¹. Las concentraciones para el lixiviado de elefante, de lombriz y de borrego fueron 0.26 ,0.34 y 0.28 µg mL⁻¹ respectivamente. Las concentraciones para la segunda fase permanecieron similares al primer experimento, Fig.51. Los valores máximos de producción de carotenoides se dieron a los 16 días del muestreo, 0.31 µg mL⁻¹ para el caso del lixiviado de borrego 0.55 µg mL⁻¹ para el caso del agua residual y 0.63 µg mL⁻¹ con el valor máximo para el medio de control. Nwoba et al. utilizaron efluentes de digestión anaerobia porcinos para cultivar las algas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en reactores tipo “raceway” y helicoidales, 160 y 40 L respectivamente. Los valores de contenido de clorofila-a variaron para el reactor helicoidal desde 1.46 a 3.67 mg L⁻¹ y para el reactor tipo “raceway”, varió entre 1 y 1.76 mg L⁻¹ (Nwoba et al. 2016).

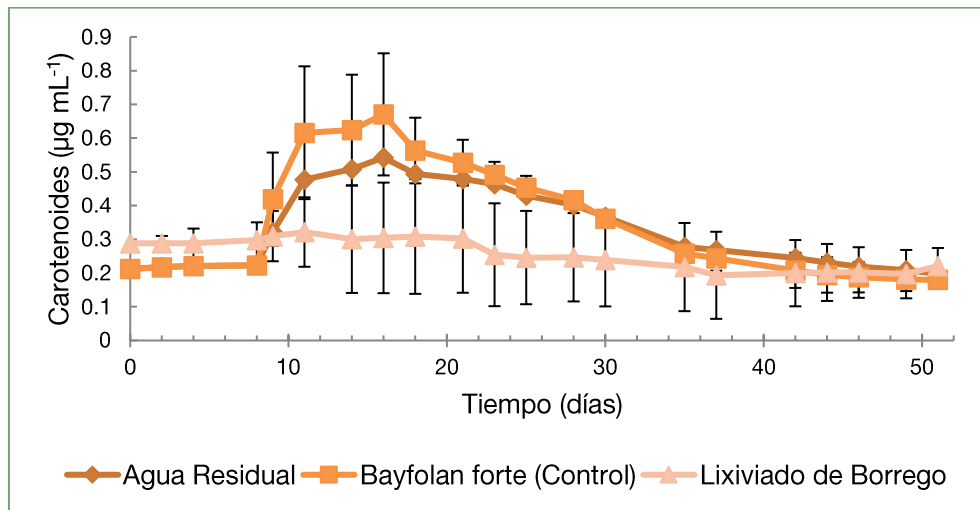


Fig.51. Producción de carotenoides para la especie *Verrucodesmus verrucosus* en diferentes medios de cultivo

La escasez de nitrógeno afecta drásticamente el crecimiento celular, si comparamos la curva de remoción de amonio del apartado siguiente, Fig.50., así como la producción de clorofila y carotenoides, observamos que al momento de que este se consume en mayor medida, la producción de ambos pigmentos decrece. En el caso del agua residual alrededor de los días 14-16, para el medio de control desde el día 18 y el lixiviado de borrego desde el comienzo del experimento fue decayendo la producción del pigmento. Esto puede deberse a las bajas concentraciones de amonio en el medio, alrededor de 2 ($\text{mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$) comparado con 63 ($\text{mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$) en el agua residual y 25 ($\text{mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$) en el medio de control. Esto se debe a que nitrógeno interviene en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas, entre las biomoléculas más importantes. También puede contribuir al contenido de RUBISCO dando como resultado una baja asimilación de carbono (Geider *et al.* 1993).

3.4 Evaluación de la remoción de Amonio y Ortofosfatos

Para la fase uno, el amonio total disminuyó drásticamente en el agua residual y en el medio Bayfolan forte en los 61 días de cultivo, de 120 mg L^{-1} a 0.35 mg L^{-1} y 28 mg L^{-1} a 0.24 mg L^{-1} respectivamente logrando altas tasas de remoción (cerca del 100%). Los demás medios, lixiviado de elefante, lixiviados de lombriz y lixiviados de borrego obtuvieron tasas de remoción de 84%, 61% y 30 % respectivamente, durante el mismo periodo de cultivo. En el segundo escalado, el valor máximo de remoción se dio en el agua residual a los 35 días de muestreo pasando de una concentración de $63.35 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ a $0.35 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ alrededor de un 99% de eficiencia seguido de un 89% para el lixiviado de borrego de $2.23 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ a $0.23 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ y 64% para el medio de control de $25.22 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ a $9.02 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$. Es importante mencionar que para los 15 primeros días en el agua residual ya se había removido la mayoría del amonio, tal como lo muestra la Fig. 52.

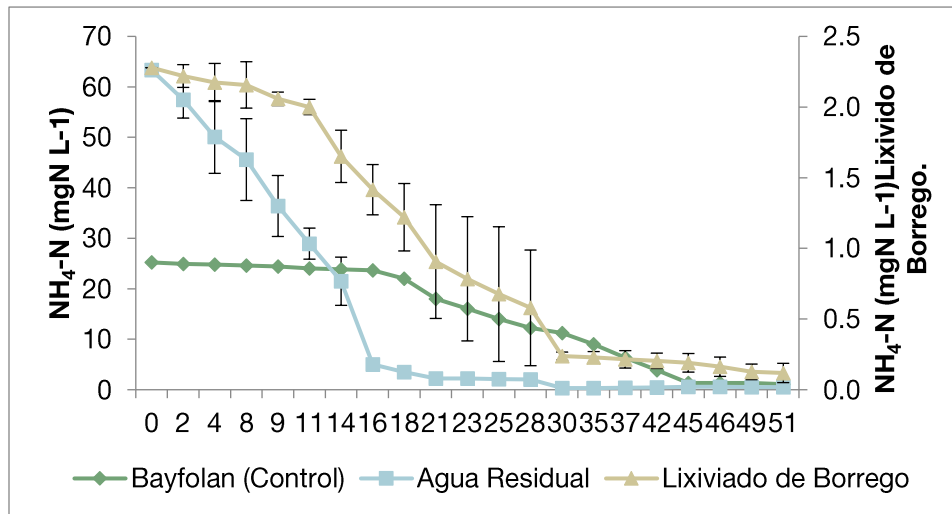


Fig. 52. Remoción de Amonio en diferentes medios de cultivo para la especie *V. verrucosus*.

Los valores de la eficiencia en remoción de nitrógeno y fósforo reportados varían dependiendo de la composición del medio y las condiciones de cultivo, principalmente las concentraciones iniciales de nutrientes, la intensidad de luz, los ciclos de luz-oscuridad y por supuesto el tipo de especie. En este estudio se alcanzaron remociones similares a otros reportes, en el caso del agua residual y el lixiviado, el consumo fue más acelerado que en el medio de control, esto puede deberse a que las bacterias presentes en estos medios pudieron descomponer otras formas de nitrógeno en fuentes asimilables para el *alga* (Zhou *et al.* 2013). El lixiviado de borrego a pesar de tener una concentración inicial mucho menor que los otros dos medios demostró en el rendimiento de biomasa tener una concentración más alta que el agua residual, lo que sugiere que no se necesitan cantidades tan grandes de amonio para obtener una concentración considerable comparada con los otros dos medios. Tal como lo muestra Hena *et al.*, comparando agua residual tratada y sin tratar con concentraciones de amonio de 0.62 ppm y 162 ppm respectivamente, teniendo una mejor tasa de remoción, cercana al 100%, el agua tratada, así como una mayor producción de biomasa (Hena *et al.* 2015).

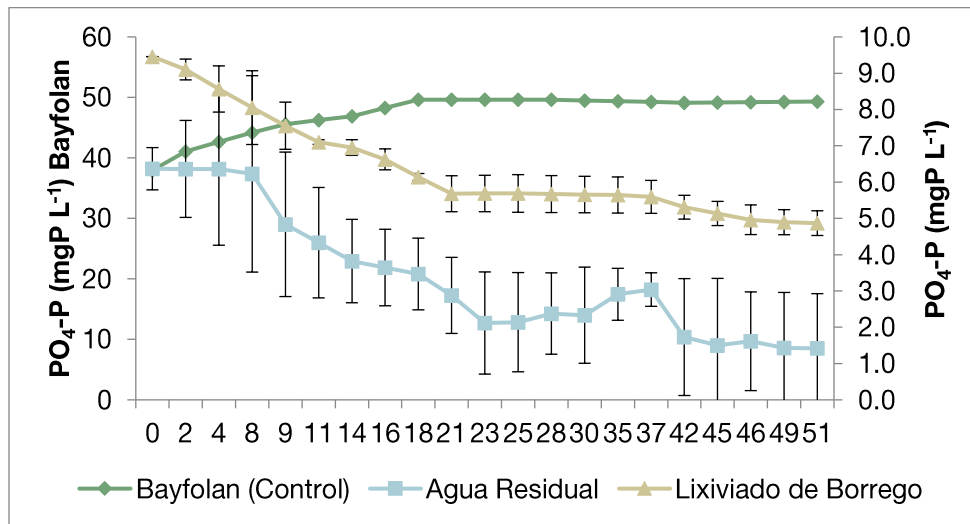


Fig. 53. Remoción de Ortofosfatos en diferentes medios de cultivo para la especie *V. verrucosus*

La tasa de remoción máxima para el fósforo en forma de ortofosfatos en la primera fase se produjo en el medio comercial Bayfolan seguida del lixiviado de elefante con una concentración inicial y final de 25.5 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ a 4.4 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ y 1.4 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ a 0.46 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente. Para los otros medios de cultivo el porcentaje de remoción fue de 36% para lixiviado de lombriz y 27% para agua residual. El lixiviado de borrego no presentó cambios significativos. Para la segunda fase, en el día 51 se alcanzó el valor máximo de remoción de ortofosfatos, este se produjo en el agua residual con un 78% de eficiencia de 6.37 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ a 1.42 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$, seguido del lixiviado de borrego con una tasa de remoción del 49% de 9.46 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$ a 4.87 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$. En el caso del medio de control aumento y este permaneció estable durante el experimento con una concentración media entre 37 y 50 $\text{PO}_4 \text{ mg L}^{-1}$, Fig.53.

Para el caso de la remoción de fósforo sobre todo en el medio de control, en experimentos con estanques de algas de alto-rendimiento (High-rate algal pond (HRAP)) se observó un aumento en la concentración de Ortofosfatos (PO_4) de 10 a 15 mg L^{-1} . Similar a este estudio en donde aumento de 40 a 50 mg L^{-1} , puede estar ligado al incremento en el pH lo que resulta en la precipitación de fosfato como un compuesto insoluble (Mustafa, Phang, y Chu 2012). Otro aspecto señalado por Andrade et al., es que las células muertas de las microalgas provocan el rompimiento de las mismas y por lo tanto la liberación de fósforo total al medio (Andrade et al. 2009) lo que puede incrementar la concentración de dicho nutriente.

Las remociones de amonio y fosfatos de este estudio, reflejan que el amonio es el nutriente limitante para el crecimiento microalgal es por ello que a lo largo de la cinética de crecimiento la relación N:P se ve afectada impidiendo el desarrollo del cultivo de manera óptima. Se estima que una relación N:P de 10 para microalgas de agua dulce es el óptimo para el crecimiento (Bohutskyi et al. 2016). Tal es el caso para la relación inicial del experimento con agua residual que en un tiempo muy corto removió al amonio disponible,

mientras que en los otros dos medios de cultivo la relación N:P fue mucho más baja, prolongando la asimilación de nutrientes y por lo tanto el crecimiento de la especie. En la Tabla 22, se muestran algunas condiciones de crecimiento y especies reportadas con algunos medios de cultivo similares a los presentados en este trabajo, sobre todo para las aguas residuales y algunas excretas animales, así como las eficiencias de remoción en amonio y ortofosfatos.

Tabla 22. Eficiencia de remoción de nutrientes para algunas especies de la familia *Scenedesmaceae*

Medio de Cultivo	Especie	Volumen (L)	Fotoperiodo	Intensidad ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Remoción de la fuente de Nitrógeno (%)	Remoción de la fuente de Fósforo (%)	Referencia
AR Artificial	<i>Scenedesmus</i> SDEC-8	0.5	-	40	25	NT-99.18	FT-98.9	(Song et al. 2014)
AR Artificial	<i>S. quadricauda</i> SDEC-13	1	-	4000 lux	25	NT-37	FT-65	(Han et al. 2014)
AR Industria papelera	<i>Scenedesmus</i> sp	30	-	250-800	28	NO ₃ -65%	PO ₄ -71.3	(Usha et al. 2016)
DG suero de queso y excreta de ganado	<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	-	NH ₄ - 83.7	PO ₄ -96.1	(Franchino et al. 2013)
AR pescadería	<i>Scenedesmus</i> sp.	150	12:12	Luz solar	30	NH ₄ -100	PO ₄ -77.54	(Andrade et al. 2009)
AR	<i>Scenedesmus abundans</i>	0.3	-	1800 lux	-	NH ₃ -98	PO ₄ -95	(Lekshmi et al. 2015)
AR	<i>Scenedesmus</i> sp.	0.2	12:12	137	26	NH ₄ -100	PO ₄ -48.70	(Chacón et al. 2004)
AR	<i>Desmodesmus</i> sp.	20	12:12	-	-	NT-80	PO ₄ -38.70	(Komolafe et al. 2014)
DG granja porcina	<i>Desmodesmus</i> sp. EJ9-6	.050	15:09	120	24	NH ₄ -100	PO ₄ -100	(Ji et al. 2014)
Excreta de cerdo	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1	12:12	228	20	NH ₄ -90	PO ₄ -80.4	(de la Noüe 1989)
AR tratada	<i>Scenedesmus acutus</i>	1	12:12	-	27	NO ₃ -43	PO ₄ -64.3	(Sacristán de Alva et al. 2013)
AR domestica	<i>Scenedesmus</i> sp. LX1	0.2	14:10	60	25	NT-98	PO ₄ -98	(Xin et al. 2010)
AR	<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	10	NT-89	FT-86	(Arbib et al. 2013)
AR municipal	<i>Scenedesmus obliquus</i>	150	-	Luz solar	11-23	NT-95	FT-92	(Gouveia et al. 2016)
AR acuicultura	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.5	16:08	120	25	NH ₄ -88.7	PO ₄ -100	(Ansari et al. 2017)
DG	<i>Scenedesmus</i> sp	0.2	-	140	27	NT-99	FT-98	(G. Kim et al. 2015)

AR, Agua Residual; DG, Digestato

3.5 Análisis del contenido de lípidos de la biomasa

En la primera fase no se cuantificaron lípidos debido a la cantidad mínima de biomasa producida por los cultivos, la cual no fue suficiente para la metodología utilizada para la cuantificación de lípidos totales. Para la segunda fase la cuantificación de lípidos totales mostró un porcentaje de 38% de lípidos en peso seco para el medio de control, seguido de 37% para el agua residual y 33% para el lixiviado de borrego, Fig.54. Estos resultados son favorables ya que basándose en la literatura un valor de 30% ya es considerado como valor medio entre las diversas especies estudiadas (Chisti 2007).

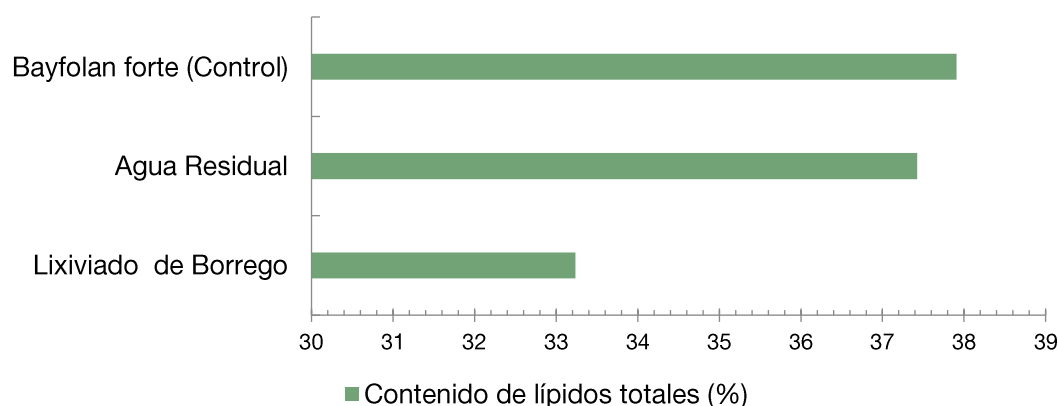


Fig.54. Contenido de lípidos totales para la especie *V. verrucosus* en diferentes medios de cultivo

Los experimentos llevados a cabo en este estudio fueron en condiciones en donde no se llevó a cabo ninguna técnica de estrés celular, ya sea por medio de un medio deficiente en nitrógeno que es la más utilizada o por la modificación del periodo de luz oscuridad (12:12). También se puede lograr modificando la temperatura o la concentración de algún nutriente en específico, por lo que se espera que en futuros trabajos se pueda realizar estrés metabólico para aumentar el contenido lipídico y mejorar el rendimiento de la especie.

Sin embargo, los resultados en la producción de lípidos son comparables e incluso están por encima de algunos otros que se reportan con especies de la misma familia en medios de cultivo similares, tal como lo muestra la siguiente tabla, Tabla 23.

Tabla 23. Comparativa en el contenido de lípidos para algunas especies de la familia *Scenedesmaceae*

Medio de Cultivo	Especie	Volumen (L)	Fotoperiodo	Intensidad ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Contenido de lípidos totales (%)	Referencia
MBB+ desperdicio de alimento	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.3	16:08	120	27	19.7	(Ji et al. 2015)
AR Artificial	<i>Scenedesmus SDEC-8</i>	0.5	-	40	25	18.29	(Song et al. 2014)
AR Artificial	<i>S. quadricauda SDEC-13</i>	1	-	4000 lux	25	25	(Han et al. 2014)
AR Industria papelera	<i>Scenedesmus sp</i>	30	-	250-800	28	15.8	(Usha et al. 2016)
AR	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1.5	14:10	143	20	49%	(Álvarez-Díaz et al. 2015)
AR granja lechera	<i>Scenedesmus sp</i>	600	12:12	120	27-32	15.73	(Hena et al. 2015)
AR	<i>Desmodesmus sp.</i>	20	12:12	-	-	~13	(Komolafe et al. 2014)
AR Comida 10%	<i>Scenedesmus bijuga</i>	0.5	-	80	30	35	(Yun et al. 2015)
AR	<i>Desmodesmus communis</i>	1	16:08	440	-	9.3	(Samori y Samori 2012)
AR domestica	<i>Scenedesmus sp. LX1</i>	0.2	14:10	60	25	33	(Xin et al. 2010)
AR	<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	10	20	(Arbib et al. 2013)
AR municipal	<i>Scenedesmus obliquus</i>	150	-	Luz solar	11-23	8.1	(Gouveia et al. 2016)
AR acuicultura	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.5	16:08	120	25	30.85	(Ansari et al. 2017)
DG desechos ave de corral	<i>Scenedesmus bijuga</i>	0.06	12:12	80	25	13.5	(Singh et al. 2011)
AR sintética	<i>Scenedesmus rubescens</i>	0.9	-	150	21	5	(Aravantinou et al. 2013)

MBB, Medio Basal Bold; AR, Agua Residual; DG, Digestato

3.6 Análisis del extracto de lípidos contenidos en la biomasa

3.6.1 Análisis del extracto

El resultado de la espectrometría de la Figura 55, indica el análisis promedio de los tres diferentes extractos; (Bay) para el medio de control, (AR) para el agua residual y (LB) para el lixiviado de borrego. Como patrón de referencia se utilizó un aceite comercial de canola. En los gráficos se pueden observar dos áreas de interés para este estudio, delimitadas entre las bandas 1700 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} y la segunda entre 2800 y 3000 cm^{-1} , representando los ésteres (C=O) y los grupos metilo y metileno (CH_2 y CH_3), respectivamente (*Dilek (Yalcin) Duygu, 2012*).

Otros autores también han obtenido espectros similares comparando el extracto de alga con aceites de referencia como aceite de coco o directamente trioleína pura, con la finalidad de comparar las bandas correspondientes con grupos de triacilglicéridos (TAGs) que corresponden a los picos de banda alrededor de 1745 cm^{-1} . Así como con las bandas características de enlaces de carbono-hidrógeno entre 2960 y 2850 cm^{-1} , compuesta principalmente por cadenas alifáticas (*Mahapatra y Ramachandra 2013; Miglio et al. 2013*). Las deformidades de los picos obtenidos en este estudio para los anchos de banda antes mencionados pueden deberse a que el extracto aún puede tener restos de biomasa u otras biomoléculas que fueron arrastradas en la extracción, que por ser cantidades muy pequeñas de material no fue posible su purificación, como lo es para el caso del aceite comercial (canola). El espectro resultante sirve como base cualitativa, en este caso, demostrando que el extracto obtenido a partir del hexano y la biomasa liofilizada en su gran mayoría es aceite de microalga, confirmando esto con los perfiles de ácidos grasos de las siguientes secciones.

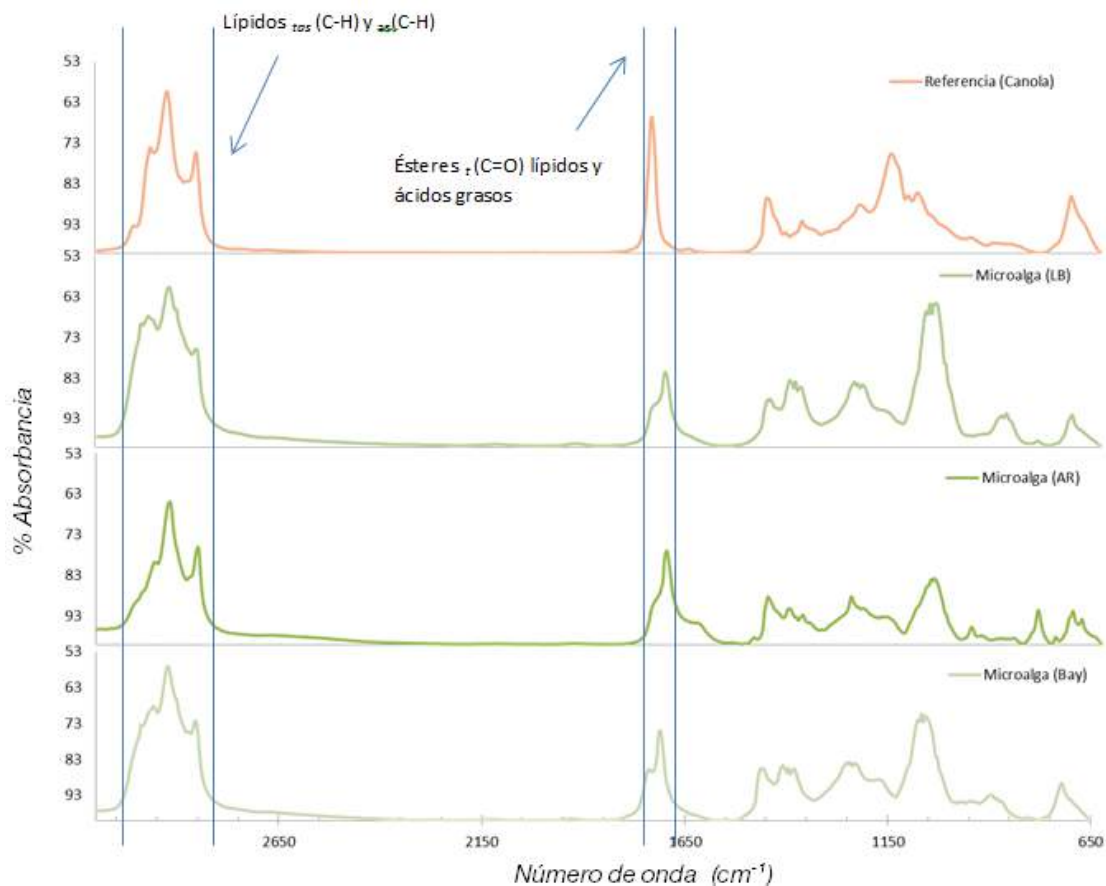


Fig. 55. Comparativa entre los espectros FTIR de los extractos obtenidos de la biomasa de *V. verrucosus* y aceite de canola.

3.6.2 Análisis de la biomasa residual previa y posterior a la extracción de lípidos

El análisis FTIR se aplicó a la biomasa liofilizada antes y después de someterla a la extracción vía Soxhlet para tener una referencia de lo que le sucede a la biomasa en su composición después de la extracción vía hexano. En la siguiente figura, Fig.56., se puede observar que en la región (L) lípidos hubo una reducción alrededor del pico 2950 cm^{-1} que representa al grupo metilo, grupo del cual están formados los ácidos grasos (Blokker et al. 1998; Dilek 2012). Otra observación relevante es que las zonas de (C) y (P) carbohidratos y proteínas no cambian significativamente con la extracción, lo cual sugiere que la biomasa puede ser utilizada para otras aplicaciones tales como digestión anaerobia para la producción de biogás, fermentación alcohólica para la obtención de bioetanol, así como una evaluación de las características protéicas de la biomasa con fines comerciales.

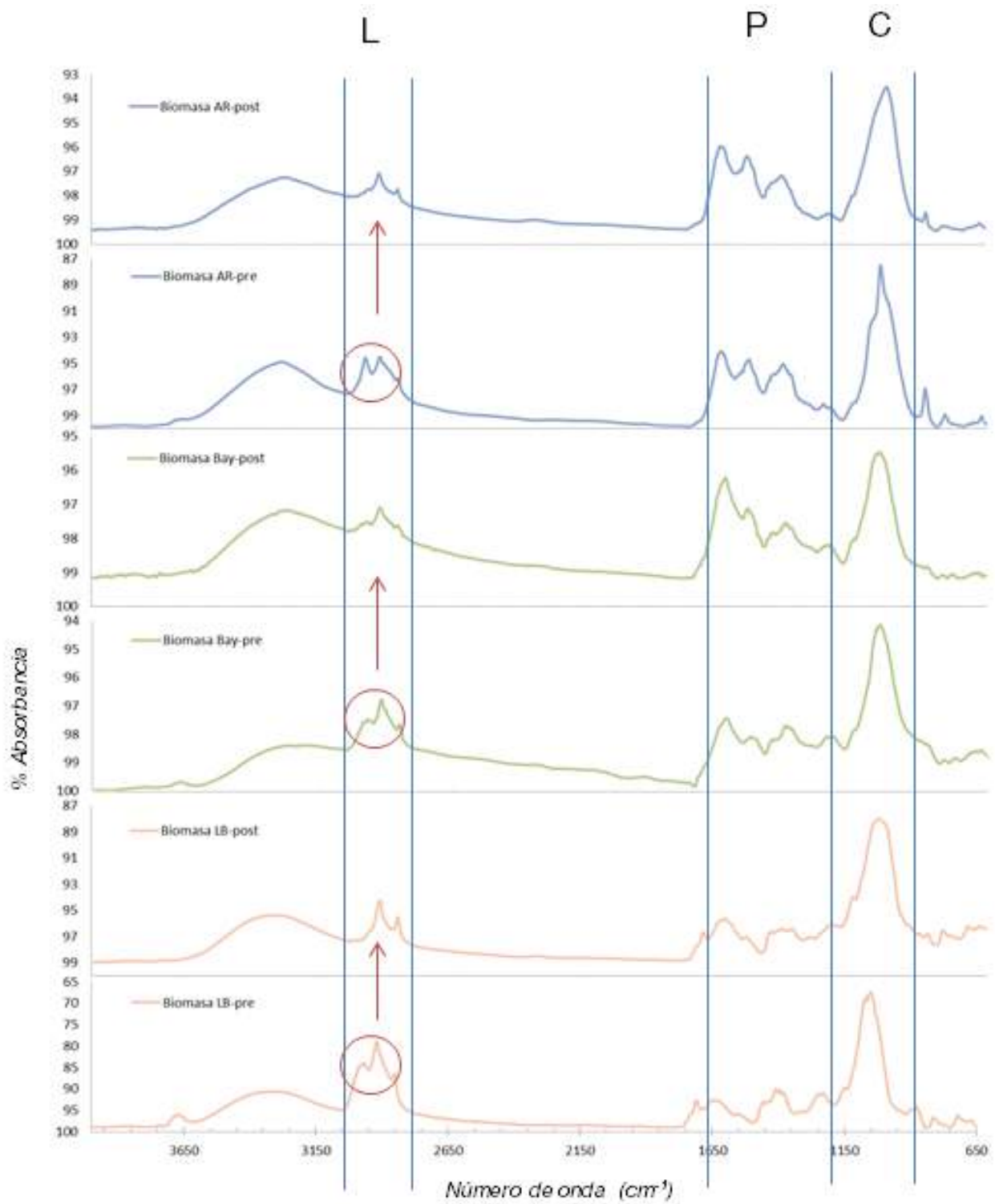


Fig.56. Comparativa entre espectros FTIR de la biomasa seca de *V. verrucosus* antes y después de la extracción de aceite.

Existen diversos reportes en donde la biomasa cosechada es valorizada y fraccionada para la obtención de más de un bioenergéticos con el fin de aumentar el rendimiento energético del proceso, así como el valor económico de productos y co-productos. Un ejemplo de esto , son los reportes de extracción de lípidos seguida de una digestión anaerobia para la obtención de metano (*Hernández et al. 2014; Sialve et al. 2009*). También existen reportes de la utilización de la biomasa para la producción de biodiesel junto con la producción de bioetanol mediante hidrólisis ácida (*Dong et al. 2016; Wang et al. 2014*), así como las tecnologías para convertir ya sea mediante procesos termoquímicos o bioquímicos la biomasa resultante en electricidad, metano hidrógeno, bio-carbón, gas de síntesis etc. (*Brennan y Owende 2010*).

3.6.3 Rendimiento de extracción de lípidos

El rendimiento determina la cantidad de extracto recuperado de la biomasa liofilizada. Es importante mencionar que la cantidad que se muestra en la tabla 24., incluye, además de los ácidos grasos, algunos otros componentes que se encontraron en la biomasa en el momento de la extracción.

Tabla 24. Rendimiento de extracción de aceite para la *V. verrucosus* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Biomasa en Soxhlet (g)	Extracción de Aceite (g)	Rendimiento de Extracción
<i>Agua Residual</i>	3	0.5502	18.34 %
<i>Bayfolan Forte (control)</i>	3	0.2441	8.14 %
<i>Lixiviado de Borrego</i>	3	0.4355	14.52 %

Los resultados se obtuvieron bajo un mínimo de biomasa colocado en el dedal de celulosa, que fueron tres gramos para el agua residual y lixiviado de borrego. Aunque para el medio de control se colocaron cerca de 12 g lo cual pudo haber afectado la capacidad de extracción del equipo Soxhlet. Por tal motivo, el rendimiento fue mucho menor que los otros dos medios. En la tabla anterior los valores de peso de aceite y rendimiento de extracción, se ajustaron a tres gramos para todos los casos. Al tomar en cuenta los valores de lípidos totales de la Fig.52., sabemos que estos incluyen tanto los lípidos polares como los no polares. Para la extracción únicamente se utilizó hexano, el cual es selectivo para lípidos no polares, por lo que el porcentaje basado únicamente en los lípidos totales y no en el peso total de la biomasa es mayor. 21.4 % para el medio de control, 43.7 % para el lixiviado de borrego y 49% para el agua residual.

Experimentos con extracción Soxhlet, reportan que, para tiempos de extracción similares a los de este estudio, se obtuvieron porcentajes que van desde 1.1 hasta 6.5 % de lípidos con base al peso seco, durante 20 horas de extracción con hexano para diferentes microalgas (Ríos *et al.* 2013), los cuales son más bajos que los que obtuvimos en este reporte. En un estudio comparativo entre diferentes métodos de extracción se mostró un rendimiento de lípidos de 59.3 % utilizando hexano mediante extracción húmeda, 6.1 % con hexano presurizado, 45.2 , 5.8 y 45% vía Soxhlet también con hexano (Mubarak *et al.* 2015). Por lo que los resultados obtenidos en esta tesis son comparables y en algunos casos superiores a los reportados por otros autores, Tabla 25.

Tabla 25. Rendimientos de extracción de lípidos vía Soxhlet comparados entre algunas especies de la familia *Scenedesmaceae*

Especie	Rendimiento de extracción (%)	Referencia
Scenedesmus almeriensis	22.4	(Hernández <i>et al.</i> 2014)
Scenedesmus sp.	~20	(Taher <i>et al.</i> 2014)
Scenedesmus obliquus 276-7	29	(Solana <i>et al.</i> 2014)
Scenedesmus sp.	5.9	(Shin <i>et al.</i> 2014)

3.6.4 Perfil de Ácidos grasos

En la Tabla 26, se muestran los ácidos grasos obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas. Se puede observar que los tres medios de cultivo tienen en su mayoría ácido palmítico y el ácido elaídico, además de concentraciones similares. Con porcentajes alrededor de 22% y 45 % respectivamente. Lo que sugiere que, no importando el medio de cultivo, en este caso, la especie *V. verrucosus* es la que metaboliza hacia estos ácidos grasos. Lo cual requiere más investigación al respecto. Se observó que en el medio de control aparece un ácido graso esencial como lo es el ácido dihomo-gamma-linolénico (omega 6), lo que puede indicar que su formación dependa en su mayoría al propio medio de cultivo. Por otro lado, en el agua residual y el lixiviado de borrego, todos los ácidos grasos son saturados e insaturados. Esto es conveniente ya que entre mayor sea el porcentaje de estos dos tipos de ácidos grasos en el aceite, mejor es la calidad de biodiesel producido (Wu y Miao 2014b).

Tabla 26. Perfil de ácidos grasos para la especie *V. verrucosus* en diferentes medios de cultivo

Ácido Graso (AG)		Medio de cultivo (% de AG respecto al total)		
Nombre Corto	Nombre típico	Control	Agua Residual	Lixiviado Borrego
8:0	Ácido Caprílico	-	0.30	0.49
12:0	Ácido Láurico	-	-	0.21
14:0	Ácido Mirístico	0.71	1.74	0.61
15:0	Ácido Pentadecanoico	-	-	0.11
16:0	Ácido Palmítico	26.26	23.25	21.68
18:0	Ácido Esteárico	-	1.37	3.39
18:1 9t (n-9)	Ácido Elaídico	46.02	45.92	49.48
20:3 (w-6)	ADGL	20.74	-	-

El ácido palmítico es uno de los ácidos grasos más comunes en la literatura y por lo tanto los más comunes para la producción de biodiesel (*Gerpen et al. 2004*). El aceite de palma contiene en su mayoría este ácido graso entre 32 y 45 % (*Sadrolhosseini et al. 2011*). En el caso de las microalgas también es un ácido graso que normalmente se encuentra en altas concentraciones. 45.5 % para *Spirulina platensis* , 16 % para *Scenedesmus obliquus* , 20.4% *Chlorella vulgaris* , 41.7 % *Dunaliella bardawil* por mencionar algunas especies (*Richmond y Hu 2013*).

El ácido elaídico se ha encontrado en diversos reportes relacionados con la producción de microalgas. Un diseño experimental con agua residual doméstica en dos fases, la primera (8días) , llamada fase de crecimiento y en una segunda (8 días), llamada fase de agotamiento de nutrientes, se añadieron de manera separada nitrógeno, fósforo, carbono y potasio a cada uno de los medios en fase de crecimiento . Con el objetivo de evaluar los cambios en el perfil de ácidos grasos. Los resultados mostraron que únicamente en el cultivo con adición de nitrógeno (nitrato de sodio) se formó el ácido elaídico. Mientras que el ácido palmítico únicamente se formó en el medio de control (sin adición extra de nutrientes) y con la adición de carbono (glucosa) (*Prathima Devi et al. 2012*). Esto podría explicar que en nuestros resultados a pesar que en el medio de control no se asimilara al 100% el fósforo, el ácido elaídico se haya formado durante la etapa de agotamiento de la fuente de nitrógeno. Por otro lado, en el estudio de *Holbrook et al.*, se observaron producciones mayores de ácido elaídico utilizando agua residual con valores de 34.3 % y 24.7 de ácido palmítico. Comparable con el contenido del aceite de soya , 55.3 % de ácido elaídico y 9.4 % de

palmítico. En este estudio, también se compara el aceite producido por esta especie con el perfil de ácidos grasos del aceite de maíz y de soya, que son las principales fuentes de biodiesel en Estados Unidos (*Holbrook et al. 2014*). En la siguiente tabla, Tabla. 27., se muestran algunos perfiles de ácidos grasos, especies y medios de cultivo. Únicamente se hace la comparación de los ácidos grasos que se obtuvieron en este estudio y no se presenta el perfil completo que los autores publicaron. En la tabla destaca el ácido eláidico como único presente en la especie *Desmodesmus comminus*, el autor reporta que se cultivó en agua residual de tratamiento secundario con un 2% de CO₂ añadido en la mezcla de aire, con una intensidad de 440 μE m⁻² s⁻¹ y una concentración muy pobre de nutrientes lo que lleva a tasas de crecimiento específicas muy lentas, pero con una alta producción en ácidos grasos saturados e insaturados, alrededor de 70%, muy similares a los resultados de esta tesis.

Tabla 27. Perfil de ácidos grasos para algunas especies de la familia *Scenedesmaceae* en diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Acidos grasos Especie	8:0	12:0	14:0	15:0	16:0	18:0	18:1 9c	18:1 9t	20:3	AGS (%)	AGI (%)	AGP (%)	Referencia
AR Industria papelera	<i>Scenedesmus</i> sp	-	-	~2.5	-	~27.5	-	~12.5	-	-	~30	~15	~45	(<i>Usha et al. 2016</i>)
AR	<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	-	-	0.3	-	26.1	5	49.2	-	-	33.3	55.1	12.5	(<i>Álvarez-Díaz et al. 2015</i>)
BG11	<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	-	-	0.06	1.20	23.47	2.61	58.88	-	-	27.48	62.46	10.06	(<i>Wu y Miao 2014a</i>)
Bold Modificado	<i>Desmodesmus</i> sp. F2	-	-	-	-	~30	~5	~30	-	-	~35	~32	~25	(<i>Ho et al. 2014</i>)
AR	<i>Desmodesmus</i> <i>communis</i>	-	-	-	-	24.5	2	22.4	20.4	-	26.5	42.8	30.7	(<i>Samon y Samon 2012</i>)
AR municipal	<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	0.40	-	2.35	-	36.9	5.8	18.9	-	-	60.25	20.83	12.13	(<i>Gouveia et al. 2016</i>)

4

CONCLUSIONES



4 Conclusiones

La especie *Verrucodesmus verrucosus* demostró adaptarse a los medios de cultivos propuestos, tanto lixiviados como agua residual. Esto sugiere que la microalga tiene el potencial para crecer en medios alternativos de cultivo y servir como un mecanismo biológico para el tratamiento de efluentes residuales, evitado principalmente eutrofización y otros tipos de contaminación. Por otro lado, se observó que no es necesario contar con tiempos de incubación demasiado largos ya que alrededor de los 14 días se puede cosechar la biomasa.

La concentración celular obtenida en este estudio fue de 0.35 g L^{-1} para el lixiviado de borrego, 0.78 g L^{-1} para el medio de control y 0.35 g L^{-1} para el agua residual. Si bien los valores son similares o superiores a algunos reportes. Es necesario realizar más experimentos para lograr una mayor concentración de biomasa en tiempos de incubación más cortos, para que sea un proceso más sustentable y rentable a escalas mayores. Además, es necesario investigar los efectos que tienen los diferentes parámetros de cultivo sobre la especie *Verrucodesmus verrucosus*. Los contenidos de pigmentos y carotenos demostraron tener una producción entre los 16 y 21 días de cultivo, precisamente en la etapa de desaceleración.

La especie *Verrucodesmus verrucosus* alcanzó tasas de remoción de amonio hasta del 100% para el agua residual y cerca del 90% en los primeros 15 días. También removi6 cerca del 80% de f6sforo de este medio, teniendo el mejor desempe6o de este estudio. Un aspecto importante de esta secci6n, es que el lixiviado de borrego a pesar de contar con tasas muy bajas de amonio, alrededor de $2 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ (10 veces menos que el medio de control y casi 30 veces menos que el agua residual), obtuvo una concentraci6n celular superior al agua residual y una producci6n de l6pidos considerable, por lo que tambi6n se sugiere como un medio de cultivo apto para el crecimiento de esta especie.

El porcentaje de l6pidos obtenidos en el agua residual de 37.4 % fue muy cercano al medio de control de 38%, contra 33.2% del lixiviado de borrego, por lo que se sugiere que los nutrientes necesarios para el medio de cultivo pueden obtenerse de los efluentes residuales, eliminando los costos de fertilizantes inorg6nicos comerciales y mejorando el balance energ6tico del sistema, as6 como el balance medioambiental.

En la espectroscop6a Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) Se observaron similitudes en los espectros de aceite comercial con los del extracto de *Verrucodesmus verrucosus*, en particular entre las bandas 1700 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} y la segunda entre 2800

y 3000 cm^{-1} , representando los ésteres ($\text{C}=\text{O}$) y los grupos metilo y metileno (CH_2 y CH_3), demostrando que el extracto obtenido en su mayoría es aceite de microalga.

Los análisis de la biomasa antes y después de la extracción por FTIR, muestran disminuciones y hasta la eliminación de bandas asociadas al grupo de ácidos grasos, alrededor de 2950 cm^{-1} , lo que significa que si hubo remoción de lípidos no polares. Por otra parte, las bandas características de los grupos amina y polisacáridos no cambiaron drásticamente. Se determinó que la biomasa aún puede utilizarse en procesos de digestión anaerobia para la producción de biogás o procesos de fermentación alcohólica para la producción de etanol o en último caso la gasificación de la biomasa como fuentes de otros bioenergéticos.

La extracción por Soxhlet tuvo rendimientos desde 21.4% hasta casi el 50% de extracción de lípidos polares en relación al porcentaje de lípidos totales de la especie.

Se obtuvo una concentración de alrededor de 70% de lípidos saturados e insaturados para todos los experimentos, siendo los ácidos grasos más representativos el ácido palmítico (aprox. 22%) y ácido eláidico (aprox. 45 %). Esta composición es comparable con el aceite de soya y de maíz, fuentes principales en Estados Unidos para la producción de biodiesel. Por lo que se concluye que la especie cuenta con las características físico-químicas para la utilización en un proceso de transesterificación para la producción de biodiesel.

4.1 Recomendaciones

La especie de trabajo requiere más investigación ya que es primera vez que se trabaja con fines bioenergéticos y de bioremediación ambiental, y por tanto son primeros registros de su potencial.

Se deben realizar experimentos con concentraciones de nutrientes variables para observar los límites de crecimiento de la especie, así como a la afectación a la producción de lípidos.

Las corridas experimentales pueden hacerse hasta 14 días ya que se observó que es el periodo en que la especie llega a su fase estacionaria y por lo tanto al agotamiento de nutrientes del medio.

Será necesario investigar cómo afectan parámetros como luz, temperatura, pH, nutrientes, volumen de cultivo y tipo de reactor en la producción no sólo de lípidos sino de carbohidratos y proteínas.

Una vez que se demostró la factibilidad de la especie para crecer en efluentes residuales, es necesario caracterizar previa y posteriormente a la incubación para observar los tiempos de remoción no sólo de amonio y ortofosfatos, sino también de otros elementos como el DBO, DQO, nitrógeno total, y hasta la remoción de metales pesados.

5

REFERENCIAS



5 Referencias

- Abdel-Raouf, N., a. a. Al-Homaidan, y I. B. M. Ibraheem. 2012. "Microalgae and wastewater treatment". *Saudi Journal of Biological Sciences* 19(3):257–75. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>).
- Ación Fernández, F. G., J. M. Fernández Sevilla, J. a. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, y Y. Chisti. 2001. "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance". *Chemical Engineering Science* 56(8):2721–32.
- Adarme-Vega, T. Catalina, Skye R. Thomas-Hall, y Peer M. Schenk. 2014. "Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production". *Current Opinion in Biotechnology* 26:14–18.
- Ahmad, Farah B., Zhanying Zhang, William O. S. Doherty, y Ian M. O'Hara. 2015. "A multi-criteria analysis approach for ranking and selection of microorganisms for the production of oils for biodiesel production." *Bioresource technology* 190:264–73. Recuperado el 17 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415006094>).
- Ahmad, Farooq, Amin U. Khan, y Abdullah Yasar. 2013. "The potential of chlorella vulgaris for wastewater treatment and biodiesel production". *Pakistan Journal of Botany* 45(SPL.ISS):461–65.
- Alfaro OG., Armas PBE, Juantorena AU. 2008. "Escalado del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* en cultivadores de película descendente. Aplicación de la teoría de los modelos para el escalado." *Tecnología Química* 28(2):11.19.
- AlgaEnergy. 2014. "Planta industrial ARCOS". Recuperado (http://www.algaenergy.es/en/dt_gallery/).
- Álvarez-Díaz, P. D. et al. 2015. "Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process". *Bioresource Technology* 181:90–96.
- Álvarez-Díaz, Pablo David et al. 2014. "Lipid production of microalga *Ankistrodesmus falcatus* increased by nutrient and light starvation in a two-stage cultivation process." *Applied biochemistry and biotechnology* 174(4):1471–83. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119548>).
- Amaro, Helena M., a. Catarina Guedes, y F. Xavier Malcata. 2011. "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel". *Applied Energy* 88(10):3402–10. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>).
- Amin, Sarmidi. 2009. "Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae". *Energy Conversion and Management* 50(7):1834–40. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.001>).
- Andersen, Robert A. (Robert Arthur). 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic Press.
- Andrade, Charity E., Alexandra L. Vera, Carmen H. Cárdenas, y Ever D. Morales. 2009. "Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery". *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia* 32(2):126–34.
- Anón. 2009. "Algal Cultures and Phytoplankton Ecology, By G. E. Fogg 2nd Edition. Madison, Wisconsin: The University of Wisconsin Press. 1975. xv+175 Pp. Price \$12.50." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 56(2):521. Recuperado el 30 de abril de 2015 (http://journals.cambridge.org/abstract_S0025315400019044).
- Ansari, Faiz Ahmad, Poonam Singh, Abhishek Guldhe, y Faizal Bux. 2017. "Microalgal cultivation using aquaculture wastewater : Integrated biomass generation and nutrient remediation". *ALGAL* 21:169–77. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>).
- Araujo, Glacio S. et al. 2013. "Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method". *Ultrasonics Sonochemistry* 20(1):95–98.
- Aravantinou, Andriana F., Marios a. Theodorakopoulos, y Ioannis D. Manariotis. 2013. "Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production". *Bioresource Technology* 147:130–34. Recuperado

- (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.024>).
- Arbib, Zouhayr et al. 2013. "Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater". *Ecological Engineering* 52:143–53. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>).
- Armas, Evidio y Orlando Alfaro. s/f. "RESIDUAL PORCINO PARA EL CULTIVO DE *Chlorella vulgaris*". 2(1):200.
- Arredondo-Vega, B. O. y D. Voltolina. 2007. "Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal". P. 97 en, editado por B. O. Vega Arredondo y D. Voltolina. B.C.S. Mexico: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz.
- Ashokkumar, Veeramuthu et al. 2015. "An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor". *Energy Conversion and Management* 101:778–86.
- Atta, Madiha, Ani Idris, Ataullah Bukhari, y Suzana Wahidin. 2013. "Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*." *Bioresource technology* 148:373–78. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241301420X>).
- Ayala, Rogelio Soto y M. D. Luque De Castro. 2001. "Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils". *Food Chemistry* 75(1):109–13.
- B Johnson, Michael y Zhiyou Wen. 2010. "Development of an attached microalgal growth system for biofuel production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(3):525–34.
- Balasubramanian, Sundar, James D. Allen, Akanksha Kanitkar, y Dorin Boldor. 2011. "Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system - design, optimization, and quality characterization". *Bioresource Technology* 102(3):3396–3403.
- Barnwal, B. K. y M. P. Sharma. 2005. "Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 9(4):363–78.
- Barrut, Bertrand et al. 2013. "Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting". *Bioresource Technology* 128:235–40. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.056>).
- Bartley, Meridith L., Wiebke J. Boeing, Alina A. Corcoran, F. Omar Holguin, y Tanner Schaub. 2013. "Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms". *Biomass and Bioenergy* 54:83–88. Recuperado el 23 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953413001633>).
- Batista, Gustavo, Guilherme A. S. Surek, Cristina Benincá, Marcos L. Corazza, y Everton F. Zanoelo. 2016. "Cyclic pressurization assisted extraction of lipids from microalgae for biodiesel production: Non-equilibrium and equilibrium data". *Fuel* 163:133–38.
- Becker, EW. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. editado por Cambridge. Cambridge University Press.
- Belarbi, Eh, E. Molina, y Y. Chisti. 2000. "A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil." *Enzyme and Microbial Technology* 26(7):516–29.
- Benemann, John. 2013. "Microalgae for Biofuels and Animal Feeds". *Energies* 6(11):5869–86. Recuperado el 18 de febrero de 2016 (<http://www.mdpi.com/1996-1073/6/11/5869/htm>).
- Bergmann, Peter y Walter Trösch. 2016. "Repeated fed-batch cultivation of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 in flat-panel airlift photobioreactors with static mixers for improved light utilization: Influence of nitrate, carbon supply and photobioreactor design". *Algal Research* 17:79–86.
- Bilad, M. R. et al. 2013. "Harvesting microalgal biomass using a magnetically induced membrane vibration (MMV) system: Filtration performance and energy consumption". *Bioresource Technology* 138:329–38.

- Bitog, J. P. et al. 2011. "Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review". *Computers and Electronics in Agriculture* 76(2):131–47. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2011.01.015>).
- Bleeke, Franziska, Gunnar Quante, Dominik Winkelmann, y Gerd Klöck. 2015. "Effect of voltage and electrode material on electroflocculation of *Scenedesmus acuminatus*". *Bioresources and Bioprocessing* 2(1):36. Recuperado el 3 de mayo de 2016 (<http://www.bioresourcesbioprocessing.com/content/2/1/36>).
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION". *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8):911–17. Recuperado el 14 de enero de 2015 (<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099#.VUBZoXsllIM>).
- Blokker, Peter et al. 1998. "Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum* , *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*". 29(5):1453–68.
- de Boer, Karne, Navid Reza Moheimani, Michael Armin Borowitzka, y Parisa Arabzadeh Bahri. 2012. "Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption". *Journal of Applied Phycology* 24(6):1681–98.
- Bohutskyi, Pavlo et al. 2016. "Effects of inoculum size , light intensity , and dose of an anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater". *ALGAL* 19:278–90. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.010>).
- Borowitzka, M. a. 1999. "Commercial production of microalgae:ponds, tanks, tubes and fermenters". *Journal of Biotechnology* 70:313–21.
- Borowitzka, Michael A. 2013. "High-value products from microalgae-their development and commercialisation". *Journal of Applied Phycology* 25(3):743–56.
- Bosma, Rouke, Wim A. Van Spronsen, Johannes Tramper, y René H. Wijffels. 2003. "Ultrasound , a new separation technique to harvest microalgae Nomenclature". *Journal of Applied Phycology* 15(m):143–53.
- Brennan, Liam y Philip Owende. 2010. "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2):557–77.
- Breuer, Guido, Packo P. Lamers, Dirk E. Martens, René B. Draaisma, y René H. Wijffels. 2013. "Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*." *Bioresource technology* 143:1–9. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413008730>).
- Bui, Thi Thuy y Mooyoung Han. 2015. "Removal of *Phormidium* sp. by positively charged bubble flotation". *Minerals Engineering* 72:108–14.
- Burlew, John S. 1953. *Current status of the large-scale culture of algae*.
- Cambra Sánchez, Jaume. 1998. *Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (Chlorophyta) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias*. Madrid: Asociación Española de Limnología.
- Carlozzi, Pietro. 2008. "Closed Photobioreactor Assessments to Grow, Intensively, Light Dependent Microorganisms: A Twenty-Year Italian Outdoor Investigation". *The Open Biotechnology Journal* 2(1):63–72.
- Cartens, M., E. Molina Grima, A. Robles Medina, A. Gimenez Gimenez, y J. Ibanez Gonzalez. 1996. "Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*". *Journal of the American Oil Chemists Society* 73(8):1025–31.
- Carvalho, Ana P., Luís A. Meireles, y F.Xavier Malcata. 2006. "Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances." *Biotechnology Progress* 22(6):1490–1506.
- Cellana. 2016. "ALDUO Technology". Recuperado (<http://cellana.com/technology/core-technology/>).

- Chacón, C. Andrade, C. Cárdenas, C. Araujo, I. y Morales, E. 2004. "Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela." *Boletín de Investigaciones Biológicas de La Universidad del Zulia*. Vol. 38(2):94 – 108.
- Chatsungnoen, Tawan y Yusuf Chisti. 2016. "Continuous flocculation-sedimentation for harvesting *Nannochloropsis salina* biomass". *Journal of Biotechnology* 222:94–103.
- Che, Raoqiong, Li Huang, y Xuya Yu. 2015. *Enhanced biomass production, lipid yield and sedimentation efficiency by iron ion*.
- Chen, Chun-Yen, Yu-Han Chang, y Hsin-Yueh Chang. 2016. "Outdoor cultivation of *Chlorella vulgaris* FSP-E in vertical tubular-type photobioreactors for microalgal protein production". *Algal Research* 13:264–70.
- Chen, Chun Yen, Kuei Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu Jong Lee, y Jo Shu Chang. 2011. "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review". *Bioresource Technology* 102(1):71–81. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>).
- Chinnasamy, Senthil, Balasubramanian Ramakrishnan, Ashish Bhatnagar, y Keshav C. Das. 2009. "Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature". *International Journal of Molecular Sciences* 10(2):518–32.
- Chisti, Yusuf. 2007. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology advances* 25(3):294–306. Recuperado el 9 de julio de 2014 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262>).
- Chiu, Sheng Yi et al. 2008. "Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor". *Bioresource Technology* 99(9):3389–96.
- Cho, Hyeon-Soo, You-Kwan Oh, Soon-Chul Park, Jae-Wook Lee, y Ji-Yeon Park. 2013. "Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*". *Renewable Energy* 54:156–60.
- Chorus, Ingrid y Jamie Bartram. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences , monitoring and management*. editado por I. Chorus y J. Bartram. E & FN Spon.
- Christenson, Logan y Ronald Sims. 2011. "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts". *Biotechnology Advances* 29(6):686–702.
- Collet, Pierre et al. 2013. "Life-Cycle Assessment of Microalgal-Based Biofuels". *Biofuels from Algae* 287–312.
- Comisión Nacional del Agua. 2012. "Atlas digital del Agua México". Recuperado (<http://www.conagua.gob.mx/atlas/usosdelagua31.html>).
- Connelly, Rhykka. 2014. *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Elsevier. Recuperado el 2 de mayo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444595614000103>).
- Converti, Attilio, Alessandro a. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, y Marco Del Borghi. 2009. "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48(6):1146–51.
- Cooney, Michael, Greg Young, y Nick Nagle. 2009. "Separation & Purification Reviews Extraction of Bio - oils from Microalgae". *Separation & purification Reveiws* 38(May 2013):291–325.
- Correll, David L. 1998. "The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review". *Journal of Environment Quality* 27(2):261.
- Costa, Jorge Alberto Vieira, Giani Andrea Linde, Daniel Ibraim Pires Atala, Guilherme Martinez Mibielli, y Roselini Trapp Krüger. 2000. "Modelling of Growth Conditions for *Cyanobacterium Spirulina Platensis* in Microcosms". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(1):15–18. Recuperado el 5 de mayo de 2016 (<http://link.springer.com/article/10.1023/A%253A1008992826344>).
- Coward, Thea, Jonathan G. M. Lee, y Gary S. Caldwell. 2013. "Development of a foam flotation system for harvesting

- microalgae biomass". *Algal Research* 2(2):135–44. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.12.001>).
- Crampon, Christelle, Adil Mouahid, Sid-Ali Amine Toudji, Olivier Lépine, y Elisabeth Badens. 2013. "Influence of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*". *The Journal of Supercritical Fluids* 79:337–44.
- Cravotto, Giancarlo et al. 2008. "Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves". *Ultrasonics Sonochemistry* 15(5):898–902.
- Csordas, Andrew y Jaw-Kai Wang. 2004. "An integrated photobioreactor and foam fractionation unit for the growth and harvest of *Chaetoceros* spp. in open systems". *Aquacultural Engineering* 30(1–2):15–30.
- Cuaresma, María, Marcel Janssen, Carlos Vilchez, y René H. Wijffels. 2011. "Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency". *Bioresource Technology* 102(8):5129–37.
- D'Alessandro, Emmanuel B. y Nelson R. Antoniosi Filho. 2016. "Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58:832–41. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>).
- Darley, W.Marshall. 1982. *Algal biology: a physiological approach*. Blackwell Scientific Publications.
- Dassey, Adam J. y Chandra S. Theegala. 2013. "Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications". *Bioresource Technology* 128:241–45. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.061>).
- Davis, Ryan, Andy Aden, y Philip T. Pienkos. 2011. "Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production". *Applied Energy* 88(10):3524–31.
- Degen, J., a. Uebele, a. Retze, U. Schmid-Staiger, y W. Trösch. 2001. "A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect". *Journal of Biotechnology* 92(2):89–94.
- Demirbas, Ayhan. 2010. "Use of algae as biofuel sources". *Energy Conversion and Management* 51(12):2738–49.
- Demirbas, Ayhan. 2011. *Competitive liquid biofuels from biomass*.
- Dilek (Yalcin) Duygu,. 2012. "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833". *African Journal of Biotechnology* 11(16):3817–24. Recuperado ([http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/23Feb/Duygu et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/23Feb/Duygu%20et%20al.htm)).
- Ding, Yu-Dong et al. 2016. "Effect of CO₂ bubbles behaviors on microalgal cells distribution and growth in bubble column photobioreactor". *International Journal of Hydrogen Energy* 41(8):4879–87.
- Dong, T., S. Van Wychen, N. Nagle, P. T. Pienkos, y L. M. L. Laurens. 2016. "Impact of biochemical composition on susceptibility of algal biomass to acid-catalyzed pretreatment for sugar and lipid recovery". *Algal Research* 18:69–77.
- Doucha, J. y K. Lívanský. 2008. "Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers." *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(3):431–40.
- Doucha, Jiří, František Straka, y Karel Lívanský. 2005. "Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor". *Journal of Applied Phycology* 17(5):403–12.
- Duan, JM y J. Gregory. 2003. "Coagulation by hydrolysing metal salts". *Advances in Colloid and Interface Science* 100–102(1):475–502.
- Duong, Van Thang et al. 2015. "High Protein- and High Lipid-Producing Microalgae from Northern Australia as Potential Feedstock for Animal Feed and Biodiesel." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3:53. Recuperado el 10 de abril de 2016 (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2015.00053/abstract>).
- ECKELBERRY, Nicholas, Michael GREEN, y Scott FRASER. 2011. "SYSTEMS, APPARATUSES, AND METHODS FOR EXTRACTING NON-POLAR LIPIDS FROM AN AQUEOUS ALGAE SLURRY AND LIPIDS PRODUCED

THEREFROM”.

- Edzwald, J. 1995. “Principles and applications of dissolved air flotation”. *Water Science and Technology* 31(3–4):1–23.
- El-Sayed, A. B. 2010. “Carotenoids Accumulation in the Green Alga *Scenedesmus* sp . Incubated with Industrial Citrate Waste and Different Inductions Stress”. *Nature and Science* 8(10):209–15.
- Ennesys. 2014. “Recycling wastewater and organic waste”. Recuperado el 4 de enero de 2017 (<http://www.ennesys.com/en/technology/>).
- EPA - Environmental Protection Agency. 1978. “determination of Phosphorous, All Forms by Colorimetric, Ascorbic Acid, Two Reagent”. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Issued):4.
- Eriksen, Niels T. 2008. “The technology of microalgal culturing.” *Biotechnology Letters* 30(9):1525–36.
- Fanés Treviño, Ingrid, Augusto Comas González, y Pedro Miguel Sánchez Castillo. 2009. “Catálogo de las algas verdes cocales de las aguas continentales de Andalucía.” Recuperado el 29 de abril de 2015 (<http://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/4019>).
- Felizardo, Pedro et al. 2006. “Production of biodiesel from waste frying oils.” *Waste management New York NY* 26(5):487–94.
- Flisar, Karel, Sasa Haberl Meglic, Jernej Morelj, Janvit Golob, y Damijan Miklavcic. 2014. “Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for E. coli inactivation and microalgae lipid extraction”. *Bioelectrochemistry* 100:44–51.
- Flottweg. 2016. “Cosecha de algas con el separador Flottweg”. Recuperado (<https://www.flottweg.com/es/aplicaciones/grasas-y-aceites/algas/>).
- Frac, Magdalena, Stefania Jezierska-tys, y Jerzy Tys. 2010. “Microalgae for biofuels production and environmental applications : A review”. *Journal of Biotechnology* 9(54):9227–36.
- Franchino, Marta, Elena Comino, Francesca Bona, y Vincenzo A. Riggio. 2013. “Chemosphere Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate”. *Chemosphere* 92(6):738–44. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>).
- Franchino, Marta, Valeria Tigini, Giovanna Cristina Varese, Rocco Mussat Sartor, y Francesca Bona. 2016. “Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggery digestate”. *Science of The Total Environment* 569:40–45.
- Gao, Kunshan. 1998. “Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: A review”. *Journal of Applied Phycology* 10(1):37–49.
- Geider, Richard J., Julie Roche, Richard M. Greene, y Miguel Olairola. 1993. “RESPONSE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM (BACILLARIOPHYCEAE) TO NITRATE, PHOSPHATE, OR IRON STARVATION1”. *Journal of Phycology* 29(6):755–66. Recuperado el 16 de octubre de 2016 (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.1993.00755.x>).
- Georgianna, D.Ryan y Stephen P. Mayfield. 2012. “Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels”. *Nature* 488(7411):329–35. Recuperado el 5 de enero de 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11479>).
- Gerardo, Michael L., Sofie Van Den Hende, Han Vervaeren, Thea Coward, y Stephen C. Skill. 2015. “Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants”. *Algal Research* 11:248–62.
- Gerken, Henri G., Bryon Donohoe, y Eric P. Knoshaug. 2013. “Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production”. *Planta* 237(1):239–53.
- Gerpen, J. Van et al. 2004. “Biodiesel Production Technology”. *Contract* (July).

- Ghernaout, Djamel y Badiia Ghernaout. 2012. "On the concept of the future drinking water treatment plant: algae harvesting from the algal biomass for biodiesel production—a review". *Desalination and Water Treatment* 49(1–3):1–18. Recuperado (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19443994.2012.708191>).
- Goldman, Joel C. 1979. "Outdoor algal mass cultures—I. Applications". *Water Research* 13(1):1–19.
- Gong, Yangmin y Mulan Jiang. 2011. "Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel". *Biotechnology Letters* 33(7):1269–84.
- Gordon, Michael H. 2006. *Chemistry of oils and fats – sources, composition, properties and uses*.
- Gouveia, Luísa et al. 2016. "Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs: Scale-up considerations". *Algal Research* 16:167–76.
- Gouveia, Luisa y Ana Cristina Oliveira. 2009. "Microalgae as a raw material for biofuels production". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(2):269–74.
- Govender, Patrick, Jody L. Domingo, Michael C. Bester, Isak S. Pretorius, y Florian F. Bauer. 2008. "Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied and environmental microbiology* 74(19):6041–52. Recuperado el 5 de enero de 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708514>).
- Graham, L. E. y L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Upper Saddle River NJ: Prentice-Hall.
- Greenwell, H. C., L. M. L. Laurens, R. J. Shields, R. W. Lovitt, y K. J. Flynn. 2010. "Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges." *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7(46):703–26.
- Grima, E. Molina, F. G. Acie, y Yusuf Chisti. 1999. "Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup". *Journal of Biotechnology* 70(1–3):231–47.
- Grobbelaar, Johan U. 2009. "Factors governing algal growth in photobioreactors: the 'open' versus 'closed' debate". *Journal of Applied Phycology* 21(5):489–92. Recuperado el 13 de julio de 2016 (<http://link.springer.com/10.1007/s10811-008-9365-x>).
- Gudin, Claude y Daniel Chaumont. 1991. "Cell fragility — The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors". *Bioresource Technology* 38(2–3):145–51.
- Guillard, Robert R. L. y John H. Ryther. 1962. "STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS: I. CYCLOTELLA NANA HUSTEDT, AND DETONULA CONFERVACEA (CLEVE) GRAN." *Canadian Journal of Microbiology* 8(2):229–39. Recuperado el 28 de abril de 2015 (<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m62-029?src=recsys#.VUAe4HsllIM>).
- Günerken, Emre, Linsey Garcia Gonzalez, Kathy Elst, Michel Eppink, y René Wijffels. 2013. "Disruption of *Neochloris oleabundans* by bead milling as the first step in the recovery of intracellular metabolites". *Current Opinion in Biotechnology* 24.
- Gutiérrez, Raquel et al. 2016. "Settling velocity distribution of microalgal biomass from urban wastewater treatment high rate algal ponds". *Algal Research* 16:409–17.
- Halim, Ronald, Michael K. Danquah, y Paul a. Webley. 2012. "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review". *Biotechnology Advances* 30(3):709–32. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>).
- Halim, Ronald, Brendan Gladman, Michael K. Danquah, y Paul a Webley. 2011. "Oil extraction from microalgae for biodiesel production." *Bioresource technology* 102(1):178–85.
- Hall, David O., F. G. Acien Fernández, E. Cañizares Guerrero, K. Krishna Rao, y E. Molina Grima. 2003. "Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity." *Biotechnology and Bioengineering* 82(1):62–73.

- Han, Lin et al. 2014. "Bioresource Technology Nutrient removal and lipid accumulation properties of newly isolated microalgal strains". *Bioresource Technology* 165:38–41. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.131>).
- Harker, Mark, Alex J. Tsavalos, Earth Sciences, y Byrom Street. 1996. "Autotrophic Growth and Carotenoid Production of Haematococcus pluvialis in a 30 Liter Air-Lift Photobioreactor". *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(2):113–18.
- Harrison, S. T. 1991. "Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products." *Biotechnology Advances* 9(2):217–40.
- Harun, Razif et al. 2011. "Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility". *Biomass and Bioenergy* 35(1):741–47. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.007>).
- Harun, Razif, Manjinder Singh, Gareth M. Forde, y Michael K. Danquah. 2010. "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(3):1037–47.
- Hautala, Keith. 2013. "Using algae to lock away greenhouse gas". Recuperado (<http://phys.org/news/2013-10-algae-greenhouse-gas.html>).
- He, Qiaoning, Haijian Yang, y Chunxiang Hu. 2016. "Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond". *Bioresource Technology* 218:571–79.
- Hegewald, Eberhard, Christina Bock, y Lothar Krienitz. 2013. "A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of Pectinodesmus and the new genera Verrucodesmus and Chodatodesmus (Chlorophyta, Chlorophyceae)". *Fottea* 13(2):149–64.
- Hena, S., S. Fatima, y S. Tabassum. 2015. "Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production". *Water Resources and Industry* 10:1–14. Recuperado (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212371715000219>).
- Henderson, Rita, Simon A. Parsons, y Bruce Jefferson. 2008. "The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae." *Water research* 42(8–9):1827–45.
- Hernández, D., M. Solana, B. Riaño, M. C. García-González, y A. Bertucco. 2014. "Biofuels from microalgae: Lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach". *Bioresource Technology* 170:370–78.
- Herrero, M., A. Cifuentes, y E. Ibanez. 2006. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review". *Food Chemistry* 98(1):136–48.
- Herrero, Miguel, Elena Ibáñez, Alejandro Cifuentes, y Javier Señoráns. 2004. "Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga. Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography." *Journal of Chromatography A* 1047(2):195–203.
- Hidalgo, Pamela, Gustavo Ciudad, y Rodrigo Navia. 2016. *Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae Botryococcus braunii for biodiesel production.*
- Ho, Shih-hsin, Jo-shu Chang, Yen-ying Lai, y Ching-nen Nathan Chen. 2014. "Bioresource Technology Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga Desmodesmus sp . F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions". *BIORESOURCE TECHNOLOGY* 156:108–16. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.017>).
- Ho, Shih Hsin, Chun Yen Chen, y Jo Shu Chang. 2012. "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO 2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N". *Bioresource Technology* 113:244–52. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>).

- Ho, Shih Hsin, Chun Yen Chen, Duu Jong Lee, y Jo Shu Chang. 2011. "Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review". *Biotechnology Advances* 29(2):189–98. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>).
- Hoffmann, James P. 1998. "WASTEWATER TREATMENT WITH SUSPENDED AND NONSUSPENDED ALGAE". *Journal of Phycology* 34(5):757–63. Recuperado el 28 de abril de 2015 (<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x>).
- Holbrook, Gabriel P. et al. 2014. "Use of the microalga *Monoraphidium* sp. grown in wastewater as a feedstock for biodiesel: Cultivation and fuel characteristics". *Applied Energy* 131:386–93. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.06.043>).
- Hu, Q., H. Guterman, y A. Richmond. 1996. "A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs." *Biotechnology and Bioengineering* 51(1):51–60.
- Hu, Q., N. Kurano, M. Kawachi, I. Iwasaki, y S. Miyachi. 1998. "Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor". *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(6):655–62.
- Huntley, Mark E. y Donald G. Redalje. 2006. "CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal". *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12(4):573–608.
- HUO, Shouliang et al. 2008. "Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages". *Journal of Environmental Sciences* 20(4):492–98.
- IEA. 2008. "From 1st to 2nd Generation Bio Fuel Technologies: An overview of current industry and RD&D activities". (November):1–124.
- Illman, Am, Ah Scragg, y Sw Shales. 2000. "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium." *Enzyme and microbial technology* 27(8):631–35.
- Iverson, S. J., S. L. Lang, y M. H. Cooper. 2001. "Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue." *Lipids* 36(11):1283–87.
- Janssen, Marcel, Johannes Tramper, Luuc R. Mur, y René H. Wijffels. 2003. "Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects". *Biotechnology and Bioengineering* 81(2):193–210.
- J Soeder, Carl. 1980. "Massive cultivation of microalgae: Results and prospects". *Hydrobiologia* 72(1):197–209.
- Ji, Fang et al. 2014. "Bioresource Technology Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater". *BIORESOURCE TECHNOLOGY* 161:200–207. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.034>).
- Ji, Min-Kyu et al. 2015. *Effect of food wastewater on biomass production by a green microalga *Scenedesmus obliquus* for bioenergy generation.*
- John, David M., Brian A. Whitton, Alan J. Brook, Natural History Museum London, y England. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Volume 1.* Cambridge University Press. Recuperado el 29 de abril de 2015 (https://books.google.com/books?id=Sc4897dfM_MC&pgis=1).
- Juantorena, a. U. et al. 2007. "Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis". *International Journal of Hydrogen Energy* 32(15 SPEC. ISS.):3133–36.
- Juantorena, A. U. et al. 2012. "Hydrogen production by microorganisms and its application in a PEMFC". *International Journal of Energy Research* 36(8):902–10.
- Kaewpintong, Kamonpan, Artiwan Shotipruk, Sorawit Powtongsook, y Prasert Pavasant. 2007. "Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor." *Bioresource Technology*

98(2):288–95.

- Kawaguchi, K. 1980. "Microalgae production systems in Asia". *Algae biomass production and use* 25–33.
- Kee Lam, Man y Keat Teong Lee. 2011. "Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win-win strategies toward better environmental protection." *Biotechnology Advances* 29(1):124–41.
- Khan, Shakeel A., Mir Z. Hussain, S. Prasad, y U. C. Banerjee. 2009. "Prospects of biodiesel production from microalgae in India". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(9):2361–72.
- Khozin-Goldberg, Inna y Zvi Cohen. 2006. "The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*." *Phytochemistry* 67(7):696–701.
- Kim, Dong-Geol, Hyun-Joon La, Chi-Yong Ahn, Yong-Ha Park, y Hee-Mock Oh. 2011. "Harvest of *Scenedesmus* sp. with biofloculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures." *Bioresource technology* 102(3):3163–68.
- Kim, Ga-yeong, Yeo-myeong Yun, Hang-sik Shin, Hee-sik Kim, y Jong-in Han. 2015. "Bioresource Technology *Scenedesmus* -based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production". *Bioresource Technology* 196:235–40. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.091>).
- Kim, Kyochan et al. 2015. "Evaluation of various harvesting methods for high-density microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101". *Bioresource Technology* 198:828–35.
- Kleinig, Andrew R. y Anton P. J. Middelberg. 1998. "On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation". *Chemical Engineering Science* 53(5):891–98.
- Koller, Martin et al. 2012. "Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: A review". *Journal of Cleaner Production* 37:377–88.
- Komolafe, Oladapo et al. 2014. "Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater". *Bioresource Technology* 154:297–304. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>).
- Koren, J. P. F. y U. Syversen. 1995. "State-of-the-art electroflocculation". *Filtration Separation* 32(2):153–146.
- Koroleff, F. 1983. "Determination of ammonia". en *Methods of seawater analysis*, editado por Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K.
- Kulkarni, Mangesh G. y Ajay K. Dalai. 2006. "Waste Cooking Oil An Economical Source for Biodiesel: A Review". *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45(9):2901–13.
- Kumar, H. D., P. K. Yadava, y J. P. Gaur. 1981. "Electrical flocculation of the unicellular green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck". *Aquatic Botany* 11(null):187–95.
- Kumar, Kanhaiya, Chitralkha Nag Dasgupta, Bikram Nayak, Peter Lindblad, y Debabrata Das. 2011. "Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria". *Bioresource Technology* 102(8):4945–53. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>).
- de la Noüe, J. 1989. "Biotreatment of Anaerobically Digested Swine Manure with Microalgae". *Biological Wastes* 29:17–31.
- Lam, Man Kee y Keat Teong Lee. 2012. "Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward". *Biotechnology Advances* 30(3):673–90. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortechadv.2011.11.008>).
- Lam, Man Kee y Keat Teong Lee. 2013. "Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ biomitigation and biodiesel production". *International Journal of Greenhouse Gas Control* 14:169–76. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijggc.2013.01.016>).
- Lam, Man Kee, Keat Teong Lee, y Abdul Rahman Mohamed. 2012. "Current status and challenges on microalgae-based carbon capture". *International Journal of Greenhouse Gas Control* 10:456–69. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>).

- Lananan, Fathurrahman et al. 2016. "Optimization of biomass harvesting of microalgae, *Chlorella* sp. utilizing auto-flocculating microalgae, *Ankistrodesmus* sp. as bio-flocculant". *International Biodeterioration & Biodegradation* 113:391–96.
- Larkum, Anthony W. D., Ian L. Ross, Olaf Kruse, y Ben Hankamer. 2012. "Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production". *Trends in Biotechnology* 30(4):198–205. Recuperado el 5 de enero de 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178650>).
- Lee, Jin-Suk et al. 2002. "Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1". *Bioresource Technology* 82(1):1–4.
- Lee, Robert Edward. 2008. *Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press. Recuperado (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=gfolAFHgusgC&oi=fnd&pg=PA31&dq=Phycology&ots=UEpslAr5zJ&sig=Krt8cMzc8XFJTXaXkhHdmoTe6Yc>).
- Lee, Young-Chul et al. 2013. "Harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by organoclays." *Bioresource technology* 132:440–45.
- Lee, Yuan-kun. 2001. "Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential". *Most* 13(4):307–15.
- Lei, Xueqian et al. 2015. *Effective harvesting of the microalgae Chlorella vulgaris via flocculation–flotation with bioflocculant*.
- Lekshmi, B., Rebekah S. Joseph, Anitta Jose, S. Abinandan, y S. Shanthakumar. 2015. "Studies on reduction of inorganic pollutants from wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans*". *Alexandria Engineering Journal* 54(4):1291–96. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2015.09.013>).
- Levin, Gilbert V, John R. Clendenning, Ahron Gibor, y Frederick D. Bogar. 1962. "Harvesting of Algae by Froth Flotation". *Applied Microbiology* 10(2):169–75.
- Li, Yanqun, Mark Horsman, Bei Wang, Nan Wu, y Christopher Q. Lan. 2008. "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*". *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(4):629–36.
- Li, Yecong et al. 2011. "Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production". *Bioresource Technology* 102(8):5138–44. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>).
- Liang, Ming Hua y Jian Guo Jiang. 2013. "Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology". *Progress in Lipid Research* 52(4):395–408. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2013.05.002>).
- Liu, Bei-Hui y Yuan-Kun Lee. 2000. "Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp." *Journal of Applied Phycology* 12(3/5):301–7. Recuperado el 5 de enero de 2017 (<http://link.springer.com/10.1023/A:1008185212724>).
- Liu, Zhi-Yuan, Guang-Ce Wang, y Bai-Cheng Zhou. 2008. "Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*." *Bioresource technology* 99(11):4717–22.
- López-González, D. et al. 2015. "Energetic, economic and environmental assessment of the pyrolysis and combustion of microalgae and their oils". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51:1752–70. Recuperado el 24 de febrero de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115006693>).
- López-Mendoza, Zitlali, Rosaluz Tavera, y Eberto Novelo. 2015. "El fitoplancton de un canal de Xochimilco y la importancia de estudiar ecosistemas acuáticos urbanos". *Tip* 18(1):13–28. Recuperado (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X15000030>).
- M.D., Guiry. 2017. "AlgaeBase". *World-wide electronic publication*.
- M Cardozo, Karina H. et al. 2007. "Metabolites from algae with economical impact." *Comparative biochemistry and*

physiology Toxicology pharmacology CBP 146(1–2):60–78.

- Mahapatra, Durga Madhab y T. V. Ramachandra. 2013. "Algal biofuel: Bountiful lipid from chlorococum sp. proliferating in municipal wastewater". *Current Science* 105(1):47–55.
- Mandal, Shovon y Nirupama Mallick. 2009. "Microalga Scenedesmus obliquus as a potential source for biodiesel production". *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(2):281–91.
- Mandal, Vivekananda, Yogesh Mohan, y S. Hemalatha. 2007. "Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research". *Pharmacognosy Review* 1(1):7–18.
- Mansour, Maged P., Dion M. F. Frampton, Peter D. Nichols, John K. Volkman, y Susan I. Blackburn. 2005. "Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24–C28 polyunsaturated fatty acids". *Journal of Applied Phycology* 17(4):287–300.
- Marker, A. F. H., E. A. Nusch, H. Rai, y B. Riemann. 1980. "The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations". *Archiv für Hydrobiologie–BeiheftErgebnisse der Limnologie* (14):91–106. Recuperado (http://books.google.com.mx/books/about/The_measurement_of_photosynthetic_pigmen.html?id=cFv_XwAACAAJ&pgis=1).
- Marsh, J. B. y D. B. Weinstein. 1966. "Simple charring method for determination of lipids." *Journal of lipid research* 7(4):574–76. Recuperado el 29 de abril de 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5965305>).
- Martínez, V., E. Cruz, y Pellón A. 2010. "COMPORTAMIENTO DE Scenedesmus obliquus EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO". *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 17(número 3):234–37.
- Masojidek, J. y G. Torzillo. 2008. *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier. Recuperado el 2 de mayo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080454054008302>).
- Masojidek, Jiří, Michal Koblížek, y Giuseppe Torzillo. 2003. "Photosynthesis in Microalgae". Pp. 20–39 en *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1002/9780470995280.ch2>).
- Mata, Teresa M., António a. Martins, y Nidia S. Caetano. 2010. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1):217–32.
- Mayers, Joshua J., Kevin J. Flynn, y Robin J. Shields. 2013. "Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy". *Bioresource Technology* 148:215–20. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.133>).
- Medina, A.Robles et al. 1995. "Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalgalsochrysis galbana". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(5):575–83.
- Mendes, Rui L. et al. 1995. "Supercritical CO2 extraction of carotenoids and other lipids from Chlorella vulgaris". *Food Chemistry* 53(1):99–103.
- Mendes, Rui L., Beatriz P. Nobre, Miguel T. Cardoso, Ana P. Pereira, y António F. Palavra. 2003. "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae". *Inorganica Chimica Acta* 356(null):328–34.
- Mercer, Paula y Roberto E. Armenta. 2011. "Developments in oil extraction from microalgae". *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(5):539–47.
- Merchant, Sabeeha S., Janette Kropat, Bensheng Liu, Johnathan Shaw, y Jaruswan Warakanont. 2012. "TAG, you're it! Chlamydomonas as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation." *Current opinion in biotechnology* 23(3):352–63. Recuperado el 25 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911007440>).

- Merchuk, J. C., M. Gluz, y I. Mukmenev. 2000. "Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp". *Journal of Chemical* 1126(July):1119–26.
- Metting, F. B. 1996. "Biodiversity and application of microalgae". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17(5–6):477–89.
- Michels, Michiel H. A., Mitra Vaskoska, Marian H. Vermuë, y René H. Wijffels. 2014. "Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm". *Water Research* 65:290–96.
- Miglio, Roberta et al. 2013. "Microalgae triacylglycerols content by FT-IR spectroscopy". *Journal of Applied Phycology* 25(6):1621–31.
- Miller, Douglas L., Sorin V Pislaru, y James E. Greenleaf. 2002. "Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation." *Somatic Cell and Molecular Genetics* 27(1–6):115–34.
- Miyamoto, K., O. Wable, y J. R. Benemann. 1988. "Vertical tubular reactor for microalgae cultivation". *Biotechnology Letters* 10(10):703–8.
- Molina, E., J. Fernández, F. G. Ación, y Y. Chisti. 2001. "Tubular photobioreactor design for algal cultures." *Journal of Biotechnology* 92(2):113–31.
- Molina Grima, E., E. H. Belarbi, F. G. Ación Fernández, A. Robles Medina, y Yusuf Chisti. 2003. "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics." *Biotechnology Advances* 20(7–8):491–515.
- Mollah, Mohammad Y. A. et al. 2004. "Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation." *Journal of Hazardous Materials* 114(1–3):199–210.
- Mubarak, M., A. Shaija, y T. V. Suchithra. 2015. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production". *Algal Research* 7:117–23.
- Mustafa, Emienour Muzalina, Siew Moi Phang, y Wan Loy Chu. 2012. "Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system". *Journal of Applied Phycology* 24(4):953–63.
- Nagle, Nick y Pete Lemke. 1990. "Production of methyl ester fuel from microalgae". *Applied Biochemistry And Biotechnology* 24–25(1):355–61.
- Do Nascimento, Mauro, Maria de los Angeles Dublan, Juan Cesar Federico Ortiz-Marquez, y Leonardo Curatti. 2013. "High lipid productivity of an *Ankistrodesmus*-*Rhizobium* artificial consortium." *Bioresource technology* 146:400–407. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241301153X>).
- Necton. 2013. "Flat panel photoreactors in the south of Portugal". Recuperado (<https://marineecologyblog.files.wordpress.com/2014/04/p1060233.jpg>).
- Negoro, Masaaki, Norio Shioji, Kazohisa Miyamoto, y Yoshiharu Micira. 1991. "Growth of Microalgae in High CO₂ Gas and Effects of SO_x and NO_x". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28–29(1):877–86. Recuperado el 4 de enero de 2017 (<http://link.springer.com/10.1007/BF02922657>).
- Nishida, I. y N. Murata. 1996. "CHILLING SENSITIVITY IN PLANTS AND CYANOBACTERIA: The Crucial Contribution of Membrane Lipids". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1):541–68. Recuperado el 5 de enero de 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012300>).
- Norsker, Niels-Henrik, Maria J. Barbosa, Marian H. Vermuë, y René H. Wijffels. 2011. "Microalgal production--a close look at the economics." *Biotechnology advances* 29(1):24–27.
- Novoveská, Lucie, Anastasia K. M. Zapata, Jeffrey B. Zabolotney, Matthew C. Atwood, y Eric R. Sundstrom. 2016. "Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors". *Algal Research* 18:86–94.
- Nwoba, Emeka G., Jeremy M. Ayre, Navid R. Moheimani, Benjamin E. Ubi, y James C. Ogonna. 2016. "Growth

- comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent". *Algal Research* 17:268–76.
- Ogbonna, James C., Toshihiko Soejima, y Hideo Tanaka. 1999. "An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors". *Progress in Industrial Microbiology* 35(C):289–97.
- Oilgae. 2010. *Comprehensive Oilgae report : energy from algae: products, market, processes & strategies*. Tamilnadu India: Oilgae.
- Olmos, Raudel Ramos, Rubén Sepúlveda Marqués, y Francisco Villalobos Moreto. 2003. *El agua en el medio ambiente : muestreo y análisis / R. Ramos Olmos, R. Sepúlveda Marqués, F. Villalobos Moreto ; pról. de Ricardo Guerra Treviño*. editado por E. P. y Valdes.
- Ono, Eiichi y Joel L. Cuello. 2004. "Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors". *Energy* 29(9–10):1651–57.
- Ortiz-Moreno, M., C. Cortés-Castillo, J. Sánchez-Villarraga, y J. Padilla. 2012. "Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas". *Orinoquia* 16(1).
- Osundeko, Olumayowa y Jon K. Pittman. 2014. "Implications of sludge liquor addition for wastewater-based open pond cultivation of microalgae for biofuel generation and pollutant remediation". *Bioresource Technology* 152:355–63. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.035>).
- Packer, Mike. 2009. "Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy". *Energy Policy* 37(9):3428–37.
- Park, Won-Kun et al. 2013. "Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production." *Applied biochemistry and biotechnology* 171(5):1128–42. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881782>).
- Patil, Vishwanath, Khanh-Quang Tran, y Hans Ragnar Giselrød. 2008. "Towards sustainable production of biofuels from microalgae." *International journal of molecular sciences* 9(7):1188–95.
- Peng, Licheng, Zisheng Zhang, Peiyao Cheng, Zhaohui Wang, y Christopher Q. Lan. 2016. "Cultivation of *Neochloris oleoabundans* in bubble column photobioreactor with or without localized deoxygenation". *Bioresource Technology* 206:255–63.
- Perez-García, Octavio, Froylan M. E. Escalante, Luz E. de-Bashan, y Yoav Bashan. 2011. "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products". *Water Research* 45(1):11–36. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>).
- Pernet, Fabrice y Réjean Tremblay. 2003. "Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters." *Lipids* 38(11):1191–95.
- Pieterse, A. J. H. y A. Cloot. 1997. "Algal cells and coagulation, flocculation and sedimentation processes". *Water Science and Technology* 36(4):111–18.
- Pires, J. C. M., M. C. M. Alvim-Ferraz, F. G. Martins, y M. Simões. 2012. "Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(5):3043–53. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.055>).
- Pittman, Jon K., Andrew P. Dean, y Olumayowa Osundeko. 2011. "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources". *Bioresource Technology* 102(1):17–25. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>).
- Prasanna, R. et al. 2010. "Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review)". *Applied Biochemistry and Microbiology* 46(2):119–34.
- Prathima Devi, M., Y. V. Swamy, y S. Venkata Mohan. 2013. "Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae

- with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation". *Bioresource Technology* 142:278–86. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.001>).
- Příbyl, Pavel, Jan Pilný, Vladislav Cepák, y Petr Kaštánek. 2016. "The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp." *Algal Research* 16:69–75.
- Pruvost, J., L. Pottier, y J. Legrand. 2006. "Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor". *Chemical Engineering Science* 61(14):4476–89.
- Pulz, O. 1994. "Plane closed-type bioreactor for production of microalgae biomass." *Fiziol Rast Moscow* 41(2):292–98.
- Pulz, O. 2001. "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(3):287–93.
- Pulz, Otto, Karl Scheibenbogen, I. G. V Institut, Arthur Scheunert-allee, y Bergholz Rehbricke. 1998. "Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input" editado por T. Scheper. *Managing* 59:123–52.
- Putt, Ron, Manjinder Singh, Senthil Chinnasamy, y K. C. Das. 2011. "An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO₂ mass transfer." *Bioresource Technology* 102(3):3240–45.
- Rachutin Zalogin, Tatyana y Uri Pick. 2014. "Inhibition of nitrate reductase by azide in microalgae results in triglycerides accumulation". *Algal Research* 3:17–23. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926413001197>).
- Radakovits, Randor, Robert E. Jinkerson, Al Darzins, y Matthew C. Posewitz. 2010. "Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production." *Eukaryotic cell* 9(4):486–501. Recuperado el 11 de julio de 2014 (<http://ec.asm.org/content/9/4/486.abstract>).
- Rai, Monika Prakash y Shivani Gupta. 2016. "Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*". *Energy Conversion and Management*. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.018>).
- Ramluckan, Krishan, Kandasamy G. Moodley, y Faizal Bux. 2014. "An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method". *Fuel* 116:103–8.
- Ramos-Suárez, Juan L., Francisco García Cuadra, F.Gabriel Ación, y Nely Carreras. 2014. "Benefits of combining anaerobic digestion and amino acid extraction from microalgae". *Chemical Engineering Journal* 258:1–9.
- Ramos, Geraldo José Peixoto, Carlos Eduardo de Mattos Bicudo, y Carlos Wallace do Nascimento Moura. 2015. "Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil". *Hoehnea* 42(3):549–66. Recuperado (<http://www.biodiversitylibrary.org/part/151997>).
- Ranjan, Amrita, Chetna Patil, y Vijayanand S. Moholkar. 2010. "Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction". *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49(6):2979–85.
- Ratha, S. K. y R. Prasanna. 2012. "Bioprospecting microalgae as potential sources of 'Green Energy'—challenges and perspectives (Review)". *Applied Biochemistry and Microbiology* 48(2):109–25.
- Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, y F. Bux. 2013. "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production". *Applied Energy* 103:444–67. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>).
- Ren, Hong-Yu et al. 2014. "Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition." *Bioresource technology* 169:763–67. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241400916X>).
- Reyes, José F. y Carla Labra. 2016. "Biomass harvesting and concentration of microalgae *scenedesmus* sp. cultivated in a pilot photobioreactor". *Biomass and Bioenergy* 87:78–83.

- Richards, R. G. y B. J. Mullins. 2013. "Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate". *Ecological Modelling* 249:59–67. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004>).
- Richardson, James W., Myriah D. Johnson, y Joe L. Outlaw. 2012. "Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest". *Algal Research* 1(1):93–100. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.04.001>).
- Richmond, Amos. 2000. "Microalgal biotechnology at the turn of the millennium : A personal view". *Journal of Applied Phycology* 12(3–5):441–51.
- Richmond, Amos. 2004. *Handbook of Microalgal Culture*. First Edit. editado por A. Richmond. Recuperado (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118567166.fmatter.summary>).
- Richmond, Amos, Sammy Boussiba, Avigad Vonshak, y Reuven Kopel. 1993. "A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors". *Journal of Applied Phycology* 5(3):327–32.
- Richmond, Amos y Qiang Hu. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. Second Edi. editado por A. Richmond y Q. Hu. Wiley Blackwell.
- Ríos, Sergio D., Joandiet Castañeda, Carles Torras, Xavier Farriol, y Joan Salvadó. 2013. "Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production". *Bioresource Technology* 133:378–88. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.093>).
- Rodolfi, L. et al. 2009. "Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor". *Biotechnology and Bioengineering* 102(1):100–112.
- Rodríguez-Palacio, M. C. y R. Vázquez-Perales. 2012. "Investigación en microalgas como alternativa energética: una experiencia de desarrollo tecnológico local". *Revista Rúbricas Ibero Puebla. Primavera-Verano* 3:40–43.
- Romero, C., P. Ramos, C. Costa, y MC Márquez. 2013. "Raw and digested municipal waste compost leachate as potential fertilizer: comparison with a commercial fertilizer". *Journal of Cleaner Production* 59:73–78.
- Roopnarain, A., V. M. Gray, y S. D. Sym. 2014. "Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production." *Bioresource technology* 156:408–11. Recuperado el 24 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414001175>).
- Rosenberg, Julian N., George A. Oyler, Loy Wilkinson, y Michael J. Betenbaugh. 2008. "A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution." *Current opinion in biotechnology* 19(5):430–36.
- Rossignol, N., L. Vandanjon, P. Jaouen, y F. Quéméneur. 1999. "Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration". *Aquacultural Engineering* 20(3):191–208.
- Ruangsomboon, Suneerat, Monthon Ganmanee, y Sakchai Choochote. 2013. "Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL". *Journal of Applied Phycology* 25(3):867–74.
- Rubio, J., M. L. Souza, y R. W. Smith. 2002. "Overview of flotation as a wastewater treatment technique". *Minerals Engineering* 15(3):139–55.
- Sacristán de Alva, Manuel, Víctor M. Luna-Pabello, Erasmo Cadena, y Edgar Ortiz. 2013. "Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production". *Bioresource Technology* 146:744–48. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.061>).
- Sadrolhosseini, Amir Reza et al. 2011. "Physical properties of normal grade biodiesel and winter grade biodiesel". *International Journal of Molecular Sciences* 12(4):2100–2111.
- Sahena, F. et al. 2009. "Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review". *Journal of Food Engineering*

95(2):240–53.

- Salim, Sina, Rouke Bosma, Marian H. Vermuë, y René H. Wijffels. 2010. "Harvesting of microalgae by bio-flocculation". *Journal of Applied Phycology* 23(5):849–55.
- Samori, Chiara y Giulia Samori. 2012. "Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I". 7.
- Samson, Réjean y Anh Leduy. 1985. "Multistage continuous cultivation of blue-green alga *spirulina maxima* in the flat tank photobioreactors with recycle". *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 63(1):105–12.
- San Pedro, A., C. V. González-López, F. G. Acién, y E. Molina-Grima. 2016. "Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in flat-panel photobioreactors". *Algal Research* 18:156–65.
- Sarat Chandra, T. et al. 2016. "Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics". *Bioresource Technology* 207:430–39.
- Sazdanoff, N. 2006. "Modeling and Simulation of the Algae to Biodiesel Fuel Cycle". *Algae* 1–58.
- Schäfer, K. 1998. "Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material". *Analytica Chimica Acta* 358(1):69–77.
- Schenk, Peer M. et al. 2008. "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production". *BioEnergy Research* 1(1):20–43.
- Scott, Stuart A. et al. 2010. "Biodiesel from algae: challenges and prospects." *Current Opinion in Biotechnology* 21(3):277–86.
- Seo, Yeong Hwan, Mina Sung, You-Kwan Oh, y Jong-In Han. 2015. *Lipid extraction from microalgae cell using UV-Fenton-like reaction*.
- Seo, Yeong Hwan, Mina Sung, You-Kwan Oh, y Jong-In Han. 2016. *Lipid extraction from microalgae cell using persulfate-based oxidation*.
- Sharma, Amit Kumar, Pradeepta Kumar Sahoo, Shailey Singhal, y Girdhar Joshi. 2016. "Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*". *Bioresource Technology* 216:793–800.
- Sharma, Kalpesh K., Holger Schuhmann, y Peer M. Schenk. 2012. "High lipid induction in microalgae for biodiesel production". *Energies* 5(5):1532–53.
- Sheehan, John. 1998. "A Look Back at the U . S . Department of Energy ' s Aquatic Species Program : Biodiesel from Algae". *Renewable Energy* 328(July):1–328.
- Shelef, G. y a Sukenik. 1984. "Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review". (0):65.
- Shin, Hee-Yong, Jae-Hun Ryu, Seong-Youl Bae, Czarena Crofcheck, y Mark Crocker. 2014. *Lipid extraction from Scenedesmus sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane*.
- Shuman, Teodora Rutar et al. 2014. "An ultra-low energy method for rapidly pre-concentrating microalgae". *Bioresource Technology* 158:217–24.
- Sialve, Bruno, Nicolas Bernet, y Olivier Bernard. 2009. "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable". *Biotechnology Advances* 27(4):409–16.
- Sierra, E. et al. 2008. "Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae". *Chemical Engineering Journal* 138(1–3):136–47.
- Siles, E. 2008. "Eliminación de nitrógeno amoniacal de aguas residuales sanitaria". *Técnica Industrial* 273 44–49.
- Singh, Manjinder, David L. Reynolds, y Keshav C. Das. 2011. "Bioresource Technology Microalgal system for treatment

- of effluent from poultry litter anaerobic digestion". *Bioresource Technology* 102(23):10841–48. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.037>).
- Singh, R. N. y Shaishav Sharma. 2012. "Development of suitable photobioreactor for algae production - A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(4):2347–53. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>).
- Skjånes, Kari, Peter Lindblad, y Jiri Muller. 2007. "BioCO₂ - a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products." *Biomolecular engineering* 24(4):405–13. Recuperado el 5 de mayo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389034407000676>).
- Solana, M., C. S. Rizza, y A. Bertucco. 2014. "The Journal of Supercritical Fluids Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids : Comparison between *Scenedesmus obliquus* , *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*". *The Journal of Supercritical Fluids* 92:311–18. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>).
- Solaris. 2015. "Elara photobioreactors". Recuperado el 1 de enero de 2017 (<http://www.solarisbiotech.com/elara-photobioreactor.html>).
- SONG, D., J. FU, y D. SHI. 2008. "Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel". *Chinese Journal of Biotechnology* 24(3):341–48. Recuperado el 25 de febrero de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872207508600163>).
- Song, Mingming et al. 2014. "Bioresource Technology Identification and characterization of a freshwater microalga *Scenedesmus SDEC-8* for nutrient removal and biodiesel production". *BIORESOURCE TECHNOLOGY* 162:129–35. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.135>).
- Soong, P. 1980. *Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan*. In: Shelef G, Soeder CJ (eds). Amsterdam: Algae biomass. Elsevier/North Holland Biomedical.
- Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, y Arsène Isambert. 2006. "Commercial applications of microalgae." *Journal of bioscience and bioengineering* 101(2):87–96. Recuperado (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497>).
- Sriram, S. y R. Seenivasan. 2012. "Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal". *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(2):9–13.
- Steen, Eric J. et al. 2010. "Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass." *Nature* 463(7280):559–62.
- Stephenson, Anna L. et al. 2010. "Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the united kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors". *Energy and Fuels* 24(7):4062–77.
- Stewart, C. 2005. "A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration??the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach". *Energy Conversion and Management* 46(3):403–20.
- Stolz, P. y B. Obermayer. 2005. "Manufacturing microalgae for skin care". *Cosmetics Toiletries* 120(3):99–106.
- Strickland, J. D. H. y Timothy Richard Parsons. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd. Fisheries Research Board of Canada. Recuperado (http://books.google.com.mx/books/about/A_Practical_Handbook_of_Seawater_Analysi.html?id=SosQAQAAMAAJ&pgis=1).
- Su, Li Chien, Yi Hsiang Hsu, y Hsiang Yu Wang. 2012. "Enhanced labeling of microalgae cellular lipids by application of an electric field generated by alternating current". *Bioresource Technology* 111:323–27. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.180>).
- Suali, Emma y Rosalam Sarbatly. 2012. "Conversion of microalgae to biofuel". *Renewable and Sustainable Energy*

- Reviews* 16(6):4316–42. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.047>).
- Suh, In Soo y Choul-Gyun Lee. 2003. "Photobioreactor engineering: Design and performance". *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8(6):313–21.
- Suresh Kumar, K., Hans-Uwe Dahms, Eun-Ji Won, Jae-Seong Lee, y Kyung-Hoon Shin. 2014. "Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation." *Ecotoxicology and environmental safety* 113C:329–52. Recuperado el 26 de diciembre de 2014 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651314005740>).
- Tabatabaei, Meisam, Masoud Tohidfar, Gholamreza Salehi Jouzani, Mohammadreza Safarnejad, y Mohammad Pazouki. 2011. "Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(4):1918–27. Recuperado el 24 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032110004351>).
- Taher, Hanifa, Sulaiman Al-Zuhair, Ali H. Al-Marzouqi, Yousef Haik, Mohammed Farid, et al. 2014. "Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up". *The Journal of Supercritical Fluids* 86:57–66.
- Taher, Hanifa, Sulaiman Al-Zuhair, Ali H. Al-Marzouqi, Yousef Haik, y Mohammed Farid. 2014. "Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production". *Biomass and Bioenergy* 66:159–67. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.02.034>).
- Talebi, Ahmad Farhad et al. 2013. "Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production". *Algal Research* 2(3):258–67. Recuperado el 11 de febrero de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926413000507>).
- Täuscher, Lothar. 2014. "Der Beitrag von Privatdozent Dr. rer. nat. habil. Lothar Krienitz zu 100 Jahren Langzeit-Untersuchungen der Besiedlung mit planktischen Mikroalgen im Feldberger Haussee (Mecklenburg-Vorpommern)". 2:107–22.
- Teo, Chee Loong y Ani Idris. 2014. *Enhancing the various solvent extraction method via microwave irradiation for extraction of lipids from marine microalgae in biodiesel production*.
- Terry, Kenneth L. y Lawrence P. Raymond. 1985. "System design for the autotrophic production of microalgae". *Enzyme and Microbial Technology* 7(10):474–87.
- Toledo-Cervantes, Alma, Marcia Morales, Eberto Novelo, y Sergio Revah. 2013. "Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*". *Bioresource Technology* 130:652–58.
- Topare, Niraj S. et al. 2011. "Extraction of oil from algae by solvent extraction and oil expeller method". 9(4):1746–50.
- Torzillo, G. et al. 1986. "Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors". *Biomass* 11(1):61–74.
- Toyub, Ma, Mi Miah, Mab Habib, y Mm Rahman. 2012. "Growth Performance And Nutritional Value Of *Scenedesmus Obliquus* Cultured In Different Concentrations Of Sweetmeat Factory Waste Media". *Bangladesh Journal of Animal Science* 37(1):86–93.
- Tredici, Mario R. 2010. "Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution". *Biofuels* 1(1):143–62.
- Tsoglin, L. N., B. V. Gabel, T. N. Fal'kovich, y V. E. Semenenko. 1996. "Closed photobioreactors for microalgal cultivation". 43(1):131–36.
- Tsukahara, Kenichiro y Shigeki Sawayama. 2005. "Liquid Fuel Production Using Microalgae". *Journal of the Japan Petroleum Institute* 48(5):251–59.
- Uduman, Nyomi, Ying Qi, Michael K. Danquah, Gareth M. Forde, y Andrew Hoadley. 2010. "Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels". *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2(1).
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi, y H. Uchiyama. 2008. "Photobioreactors for mass cultivation of algae". *Bioresource Technology*

- 99(10):4021–28.
- Ugwu, C. U., J. C. Ogbonna, y H. Tanaka. 2002. "Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers." *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(5):600–607.
- Usha, M. T., T.Sarat Chandra, R. Sarada, y V. S. Chauhan. 2016. "Bioresource Technology Removal of nutrients and organic pollution load from pulp and paper mill effluent by microalgae in outdoor open pond". *Bioresource Technology* 214:856–60. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.060>).
- Valdez-Ojeda, Ruby et al. 2015. "Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production". *Algal Research* 7:33–44. Recuperado (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926414001301>).
- Valencia, D. 2012. *Capacidad de remoción de amonio y ortofostato, a gran escala, de dos especies de microalgas*.
- Vandamme, Dries, Imogen Foubert, Boudewijn Meesschaert, y Koenraad Muylaert. 2010. "Flocculation of microalgae using cationic starch". *Journal of Applied Phycology* 22(4):525–30.
- Voltolina, Domenico, Mario Nieves, Guadalupe Navarro, Teresa Oliva, y Dulce Peraza. 1998. "The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth". *Aquacultural Engineering* 19(1):7–15.
- Vonshak, A. and Torzillo, G. 2004. *Environmental stress physiology. In: Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A. Blackwell.
- Vonshak, Avigad y Amos Richmond. 1988. "Spirulina": 15(30):233–47.
- Vunjak-Novakovic, Gordana, Yoojeong Kim, Xiaoxi Wu, Isaac Berzin, y José C. Merchuk. 2005. "Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies". *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44(16):6154–63.
- Van Wageningen, Jon et al. 2012. "Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*". *Energies* 5(3):731–40.
- Wang, Changfu, Xiaoqing Yu, Hong Lv, y Jun Yang. 2013. "Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp". *Journal of Environmental Biology ISSN: 34(April)*:421–25.
- Wang, Hui et al. 2014. "Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp." *Bioresource Technology* 172:169–73.
- Wang, Liang et al. 2010. "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(4):1174–86.
- Wang, Shuai et al. 2015. "Cultivation of the benthic microalga *Prorocentrum lima* for the production of diarrhetic shellfish poisoning toxins in a vertical flat photobioreactor". *Bioresource Technology* 179:243–48.
- Wang, Ting, Wen-Long Yang, Yu Hong, y Yang-Long Hou. 2016. "Magnetic nanoparticles grafted with amino-riched dendrimer as magnetic flocculant for efficient harvesting of oleaginous microalgae". *Chemical Engineering Journal* 297:304–14.
- Watanabe, Yoshitomo y Hiroshi Saiki. 1997. "Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas." *Energy Convers Manage* 38(Suppl., Proceedings of the Third International Conference on Carbon Dioxide Removal, 1996):S499–503.
- Wong, Diana M. y Annaliese K. Franz. 2013. "A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricorutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy". *Journal of Microbiological Methods* 95(2):122–28. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.026>).
- Wu, Hongqin y Xiaoling Miao. 2014a. "Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels". *Bioresource Technology* 170:421–27.
- Wu, Hongqin y Xiaoling Miao. 2014b. "Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa*

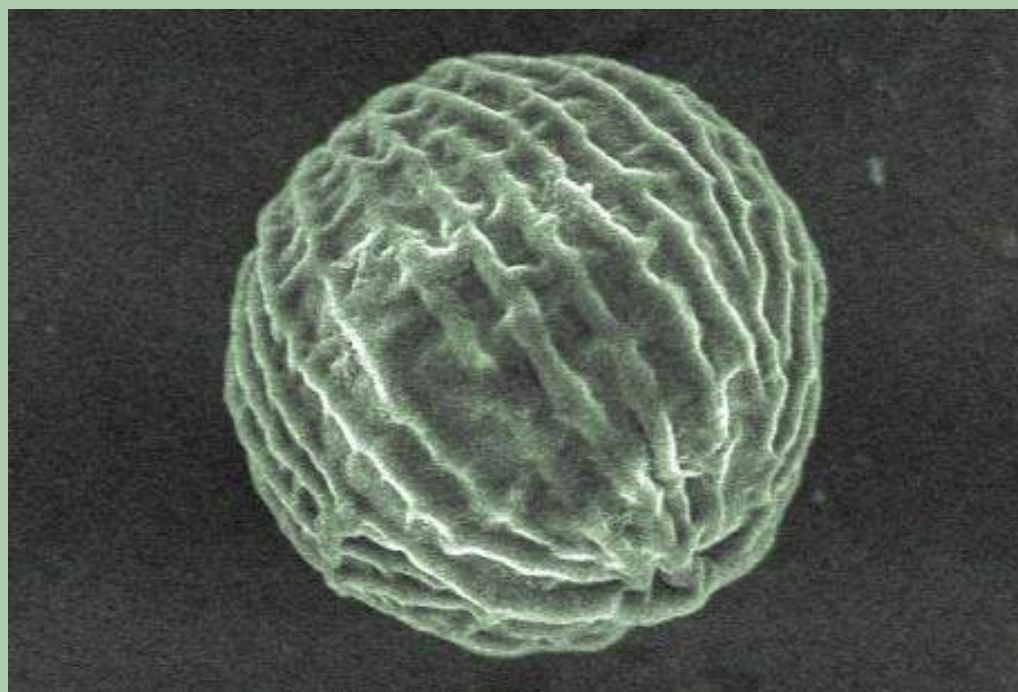
- and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels". *Bioresource Technology* 170:421–27. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.017>).
- Wu, Li Fen, Pei Chung Chen, y Chi Mei Lee. 2013. "The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae". *International Biodeterioration & Biodegradation* 85:506–10. Recuperado (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830513001984>).
- Wu, Xiaodan, Rongsheng Ruan, Zhenyi Du, y Yuhuan Liu. 2012. "Current status and prospects of biodiesel production from microalgae". *Energies* 5(8):2667–82.
- Xin, Li, Hu Hong-ying, y Yang Jia. 2010. "Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing". *New BIOTECHNOLOGY* 27(1):59–63. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.11.006>).
- Xin, Li, Hu Hong-ying, y Zhang Yu-ping. 2011. "Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature". *Bioresource Technology* 102(3):3098–3102. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>).
- Xu, Ling, Pamela J. Weathers, Xue-Rong Xiong, y Chun-Zhao Liu. 2009. "Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities". *Engineering in Life Sciences* 9(3):178–89.
- Yang, Libin et al. 2015. "Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater". *Bioresource Technology* 181:54–61. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.043>).
- Yasemin Bulut Mutlu, Oya Işık, Leyla Uslu, Kemal Koç y Yaşar Durmaz. 2011. "The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae).pdf". 10(3):453–56. Recuperado (<http://www.academicjournals.org/AJB>).
- Yeh, Kuei Ling y Jo Shu Chang. 2012. "Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31". *Bioresource Technology* 105:120–27. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>).
- Yen, Hong-Wei, Pin-Wen Chen, y Li-Juan Chen. 2015. "The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation." *Bioresource technology* 184:148–52. Recuperado el 26 de marzo de 2016 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414013728>).
- Yeomans, Michelle. 2013. "New photobioreactor makes microalgae cultivation easier for the industry". Recuperado (<http://www.cosmeticsdesign-europe.com/Formulation-Science/New-photobioreactor-makes-microalgae-cultivation-easier-for-the-industry>).
- Yun, Dong et al. 2015. "Bioresource Technology Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent". 184:215–21.
- Zhang, Chun-Dan et al. 2016. "A new technology of CO₂ supplementary for microalgae cultivation on large scale – A spraying absorption tower coupled with an outdoor open runway pond". *Bioresource Technology* 209:351–59.
- Zhang, K., S. Miyachi, y N. Kurano. 2001. "Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: Effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency". *Applied Microbiology and Biotechnology* 55(4):428–33.
- Zhang, Qi-Qi et al. 2013. "Investigation on characteristics of leachate and concentrated leachate in three landfill leachate treatment plants". *Waste Management* 33(11):2277–86.
- Zhen-feng, Su, Li Xin, Hu Hong-ying, Wu Yin-hu, y Noguchi Tsutomu. 2011. "Bioresource Technology Culture of *Scenedesmus* sp. LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo-

- membrane bioreactor". *Bioresource Technology* 102(17):7627–32. Recuperado (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.009>).
- Zheng, Hongli et al. 2011. "Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(7):1215–24.
- Zheng, Yi, Rui Xiao, y Mark Roberts. 2016. "Polymer-enhanced enzymatic microalgal cell disruption for lipid and sugar recovery". *Algal Research* 14:100–108.
- Zhou, Yan et al. 2013. "A synergistic combination of algal wastewater treatment and hydrothermal biofuel production maximized by nutrient and carbon recycling". *Energy & Environmental Science* 6(12):3765. Recuperado el 17 de octubre de 2016 (<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ee24241b>).
- Zittelli, Graziella Chini, Liliana Rodolfi, y Mario R. Tredici. 2003. "Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors". *Journal of Applied Phycology* 15(2/3):107–14.

6

ANEXOS

- Producción Científica
- Actividades Académicas



6 Anexos

6.1 Producción científica

- E. G. Arenas, M. C. Rodríguez Palacio, A. U. Juantorena, S. E. L. Fernando, P. J. Sebastian. ***Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges***. Int. J. Energy Res. (2016). DOI: 10.1002/er.3663
- Santis L.E., Saldaña S., E.G. Arenas. ***Bioetanol a partir de desechos agroindustriales***. Editorial Académica Española (2016)

6.2. Actividades Académicas

Docencia

- Profesor ayudante de la Licenciatura en Ingeniería en Energías Renovables (LIER, 2016), impartiendo la materia de Bioenergía I.

Cursos

- **Curso de Biorreactores de Partición** (2014,12h)– Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
- **Curso de Tratamiento de aguas residuales y producción de biocombustibles a partir de microalgas** (2013,15h) – Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Congresos y Conferencias

- **Sesión Poster con el tema “Identificación de microalgas para usos bioenergéticos en Temixco, Morelos”**, Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables CNEER (08-11 de noviembre 2016, IER-UNAM México).
- **Sesión Poster con el tema “Evaluación del crecimiento de la microalga *Verrucodesmus verrucosus* en agua residual bajo diferentes intensidades de luz”**, Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables CNEER (08-11 de noviembre 2016, IER-UNAM México).
- **Sesión Oral con el tema “Proyecto GIRO-IER: Gestión Integral de Residuos Orgánicos”**, Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables CNEER (08-11 de noviembre 2016, IER-UNAM México).
- **Ponente del tema “Biocombustibles”**, Jornada de las Energías Renovables (27-de octubre 2016, IER-UNAM México).

- Conferencia **“Biodiesel”**, (10-08 de agosto 2016, Universidad Politécnica del Estado de Guerrero, México).
- Sesión Poster con el tema **“GC-MS and FTIR spectroscopic determination of lipids and fatty acid profile of microalgae *Verrucodesmus verrucosus* under different residual culture media”**, The 6th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (26-29 de Junio-2016, San Diego USA)
- Sesión Poster con el tema **“Extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal para La producción de biodiesel “**, XV Congreso Internacional y XXI Congreso Nacional De Ciencias Ambientales (15-17 de junio de 2016, Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México)
- Sesión Poster con el tema **“Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods and other challenges”**, Third International Symposium on Renewable Energy and Sustainability (09-11 de septiembre 2015, IER-UNAM México).
- Sesión Poster con el tema **“Microalgas para biorremediación y producción de biodiesel”** Third International Symposium on Renewable Energy and Sustainability (09-11 de septiembre-2015, IER-UNAM México).
- Sesión Poster con el tema **“Wastewater treatment and lipid production by the microalgae *Verrucodesmus verrucosus*”**, XXIV International Materials Research Congress (16-20 de agosto-2015, Cancún México)
- Sesión Poster con el tema **“Microalgae culture systems as an alternative for biodiesel and food generation”**, XXIV International Materials Research Congress (16-20 de Agosto-2015, Cancún México)
- Sesión Oral con el tema **“Doble función de la microalga *Verrucodesmus verrucosus* en el tratamiento de efluentes residuales y producción de lípidos.”**, XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (21-26 de junio-2015, Guadalajara Jalisco, México).
- Sesión Poster con el tema **“Production to Lipids and β -carotene by the microalgae *Dunaliella salina* in alternative culture media”**, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (7-10 de junio-2015, San Diego USA)
- Sesión Poster con el tema **“*Verrucodesmus verrucosus* as a potential source of lipids and its use in wastewater treatment”**, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (7-10 de Junio-2015, San Diego USA)
- Conferencia con el tema **“Biomasa, Alcances y Aplicaciones”**, 1er. Congreso Nacional de Ingenierías (25-29 de mayo de 2015, Instituto Tecnológico de Tláhuac III, México).
- Sesión Oral con el tema **“Use of microalgae *Verrucodesmus Verrucosus* for bioenergy applications and environmental bioremediation”**, 2014 Asia

- Biohylinks (ABHL) meeting Asia Biohydrogen and Biorefinery (ABB) Symposium (16-18 de diciembre-2014, Melaka Malasia).
- **Sesión Poster con el tema “Tratamiento de lixiviados orgánicos y agua residual municipal con microalgas”,** XIX Simposio Departamento Ciencias de la Salud (26-28 de noviembre-2014, UAM Iztapalapa DF México).
 - **Conferencia con el tema “Microalgas, una alternativa para el uso de bioenergéticos y bioremediación ambiental”,** Jornada de Energías Renovables (12,13 y 14 de noviembre de 2014, Instituto Tecnológico de Tláhuac III, México).
 - **Sesión Poster con el tema “Nutrients Removal in alternative culture media by microalgae Chlorella sp.”,** XXIII International Material Research Congress (17-21 de agosto-2014, Cancún México).
 - **Sesión Poster con el tema “Culture to Dunaliella salina in alternative culture media. Production β -carotene and fatty polyunsaturated.”,** XXIII International Material Research Congress (17-21 de agosto-2014, Cancún México).
 - **Sesión Poster con el tema “Microalgae cultures Botryococcus brauni and Desmodesmus quadricauda as a potential source of biofuel.”,** XXIII International Material Research Congress (17-21 de Agosto-2014, Cancún México).
 - **Sesión Poster con el tema “Cultivo de Chlorella sp. en lixiviados orgánicos y agua residual municipal.”,** XI International Meeting of the Mexican Society of Planktology (26-30 de mayo-2014, Universidad Autónoma de Aguascalientes).
 - **Sesión Poster con el tema “Remoción de fósforo en agua residual, lixiviados de lombriz y borrego mediante la microalga Chlorella sp.”,** 1er Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables (29-30-31 de octubre-2013, IER-UNAM, México).
 - **Sesión Poster con el tema “Metodología para el cultivo, extracción y cuantificación de lípidos de Chlorella vulgaris”,** VII Congreso Nacional de Ficología (16-18 de octubre-2013, FES-UNAM, México).
 - **Sesión Poster con el tema “Biodiesel Production from Chlorella vulgaris”,** XXII International Material Research Congress (11-15 de agosto-2013, Cancún México).
 - **Sesión Poster con el tema “Microalgae: A Potential Source For Biodiesel Production”,** 2° Simposio Internacional Sobre Energías Renovables y Sustentabilidad (20-22 de marzo-2013, IER-UNAM, México).
 - **Sesión Oral con el tema “Microalgas y Biodiesel”,** 11° Congreso de Estudiantes (23-25 de octubre-2012, CIE-UNAM, México).

Otros

- **Ponente y coordinador del Taller “Microalgas como fuente de biocombustibles de tercera generación”,** Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables (08-10 de noviembre de 2016), Instituto de Energías Renovables - UNAM
- **Participación en la Coordinación de Conferencias Magistrales del Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables CNEER** (08-11 de noviembre de 2016), Instituto de Energías Renovables - UNAM
- **Revisor de los trabajos del área de Bioenergía presentados en el Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables CNEER** (08-11 de noviembre de 2016), Instituto de Energías Renovables – UNAM
- **Expositor del laboratorio de “Bioenergía”,** Jornada de las Energías Renovables (27-de octubre 2016, IER-UNAM México).
- **Ponente y coordinador del Taller de Biocombustibles,** Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables (07-09 de septiembre de 2015) Instituto de Energías Renovables – UNAM
- **Ponente y coordinador del Taller de Biocombustibles,** Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables (03-04-05 de noviembre de 2014) Instituto de Energías Renovables - UNAM
- **Expositor del tema Microalgas. Sus usos y aplicaciones** (14-19 de octubre de 2014) – “*7ª Feria de Ciencias*”, UAM Iztapalapa
- **Ponente y coordinador del Taller de Biocombustibles,** Congreso Nacional de Estudiantes de Energías Renovables (29-30-31 de octubre de 2013) Instituto de Energías Renovables - UNAM
- **Pensamiento Científico** (2013,40h) – “*Curso en línea*”, Coursera.org /Universidad Nacional Autónoma de México
- **Instructor del Taller Secado Solar “Evento Puertas Abiertas”,** (19 de marzo de 2013, Instituto de Energías Renovables-UNAM)