



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y  
producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua  
residual y lixiviado”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANDREA HERNÁNDEZ GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Teresa Orta Ledesma**  
Facultad de Ciencias UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Eberto Novelo Maldonado**  
Facultad de Ciencias UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Germán Buitrón Méndez**  
Facultad de Ciencias UNAM

**MÉXICO, Cd Mx. 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y  
producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua  
residual y lixiviado”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANDREA HERNÁNDEZ GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Teresa Orta Ledesma**  
Facultad de Ciencias UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Eberto Novelo Maldonado**  
Facultad de Ciencias UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Germán Buitrón Méndez**  
Facultad de Ciencias UNAM

**MÉXICO, Cd Mx. ENERO, 2017**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/017/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **HERNÁNDEZ GARCÍA ANDREA** con número de cuenta **304016185** con la tesis titulada "**Efecto de las condiciones de cultivo en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en agua residual y lixiviado**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA**:

Presidente: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA  
Vocal: M. EN C. ISAURA YÁÑEZ NOGUEZ  
Secretario: DR. EBERTO NOVELO MALDONADO  
Suplente: M. EN C. ELIZABETH RAMÍREZ FLORES  
Suplente: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la formación recibida durante los estudios de Maestría y el apoyo para realizar este trabajo.

Al programa CONACYT - Becas nacionales – CVU 625020 por el apoyo recibido para la realización y conclusión de este trabajo.

Al Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética por el apoyo otorgado a este proyecto de investigación. No. de proyecto 220704.

A la UNAM por el apoyo recibido a través del programa PAEP.

A mi asesora la Dra. Ma. Teresa Orta Ledesma por todo el apoyo brindado, durante la elaboración de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Eberto Novelo Maldonado y el Dr. Germán Buitrón Méndez por su tiempo, sus comentarios y sugerencias durante la realización de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mi directora de tesis, la Dr. Ma. Teresa Orta Ledesma, por brindarme su apoyo y permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A la M. en C. Isaura Yáñez Noguez y al Dr. Ignacio Monje Ramírez por su apoyo académico y profesional, que así mismo contribuyeron a la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA), el cual pertenece al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Al Dr. Eberto Novelo y su grupo de trabajo por apoyarme durante la realización de esta tesis y hacer agradable la estancia en su laboratorio.

Al Dr. Germán Buitrón por sus comentarios que me permitieron ver mi trabajo desde otro punto de vista.

A la Mtra. Elizabeth Flores por su tiempo, sus sugerencias y observaciones en la redacción de la tesis.

Al Dr. Hugo Perales por su tiempo y sus comentarios en la revisión de este trabajo ya que me fueron de mucha ayuda para mejorar la redacción de la tesis.

A mis padres por todo el apoyo brindado, por su esfuerzo y porque siempre procuraron sacarnos adelante a mí y a mis hermanas, gracias por creer en mí y alentarme a seguir estudiando y continuar con mi preparación académica y profesional, este logro también es de ustedes, tienen toda mi admiración y respeto, gracias por todo.

A mis hermanas por siempre estar a mi lado en todo momento, porque no sólo son mis hermanas si no también unas grandes amigas.

A Daniel, el amor de mi vida, por su apoyo incondicional, su compromiso, por alentarme cada día a dar lo mejor de mí. Gracias por motivarme a nunca renunciar y siempre seguir adelante. Te amo.

A mi suegra por todo su apoyo, sus consejos y por abrirme las puertas de su casa.

A Anahí, Samantha, Paola y Oscar por brindarme su amistad y que a pesar de no vernos tan seguido sé que cuento con ustedes.

A Tere por su apoyo y consejos en el laboratorio y durante el tiempo transcurrido en el instituto y que además de ser una compañera, se convirtió en una amiga.

A Isaac, Verito y Santiago por hacer agradables los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por la ayuda y el apoyo que me dieron durante mi estancia en el instituto, además de brindarme su amistad y consejos.

A mis compañeros del cubículo 410 por hacer agradable mi estancia en ese lugar y los buenos momentos compartidos.

“GRACIAS A TODOS”



# INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Microalgas. Generalidades	7
2.2 Aplicaciones e importancia biotecnológica	7
2.3 Problemática de Aguas Residuales	8
2.4 Problemática de los lixiviados de relleno sanitario	9
2.5 Tratamiento del agua residual y el lixiviado mediante el uso de microalgas	10
2.6 Composición bioquímica de las microalgas	13
2.7 Factores que influyen en la composición bioquímica y el crecimiento	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
5. HIPÓTESIS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Muestreo de agua residual y lixiviado	21
6.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos del agua residual y el lixiviado	21
6.3 Cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> en agua residual	23
6.4 Determinación de las especies de <i>Desmodesmus</i> spp.	23
6.5 Cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> en una mezcla de agua residual y lixiviado	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 Caracterización del agua residual y el lixiviado	31
7.2 Determinación de especies	33
7.3 Remoción de nutrientes en agua residual	31
7.4 Cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> en una mezcla de agua residual y lixiviado	37
8. CONCLUSIONES	51
9. LITERATURA CITADA	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Intercambio de CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> entre las microalgas y las bacterias	13
Figura 2. Diagrama general de la metodología	20
Figura 3. Punto de muestreo de lixiviados de etapa III del relleno sanitario Bordo Poniente. Fotos de la autora	21
Figura 4. a) Cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> b) Cultivo en agua residual c) Cultivo en la mezcla de agua residual y lixiviado al 15%	25
Figura 5. Curva de calibración para carbohidratos totales utilizando glucosa	27
Figura 6. Curva de calibración para lípidos totales utilizando aceite de canola	28
Figura 7. Cromatograma de FAME Mix C8-C24 (Sigma Aldrich, 18918-1AMP)	30
Figura 8. Especies determinadas de <i>Desmodesmus</i> . a) <i>Desmodesmus intermedius</i> , b) <i>Desmodesmus opoliensis</i> , c) <i>Desmodesmus magnus</i> y d) <i>Desmodesmus communis</i>	32
Figura 9. <i>Scenedesmus obliquus</i> . a) forma unicelular, b) cenobio de 4 células	32
Figura 10. Curvas de crecimiento medida como SSTmg/L de los dos géneros de microalgas	33
Figura 11. Monitoreo durante 28 días, de los parámetros fisicoquímicos de <i>Desmodesmus</i> spp.	35
Figura 12. Monitoreo durante 28 días, de los parámetros fisicoquímicos de <i>S. obliquus</i>	35
Figura 13. Porcentaje de lípidos y carbohidratos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> en agua residual. D lípidos= % de lípidos en <i>Desmodesmus</i> spp., D cho's= % de carbohidratos en <i>Desmodesmus</i> spp., S lípidos= % de lípidos en <i>S. obliquus</i> , S cho's= % de carbohidratos en <i>S. obliquus</i>	36
Figura 14. Crecimiento de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> en agua residual y lixiviado al 7, 10 y 15%. D= <i>Desmodesmus</i> spp., S= <i>S. obliquus</i> .	40

Figura 15. Crecimiento de <i>Desmodemus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> durante la fase de limitación de nutrientes. D= <i>Desmodemus</i> spp., S= <i>S. obliquus</i> , C= control, L= limitación de nutrientes	43
Figura 16. Porcentaje de carbohidratos totales de los cultivos de <i>Desmodemus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> durante la fase de estrés. D= <i>Desmodemus</i> spp., S= <i>S. obliquus</i> , C= control, E= estrés	44
Figura 17. Porcentaje de lípidos totales de los cultivos de <i>Desmodemus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> durante la fase de estrés. D= <i>Desmodemus</i> spp., S= <i>S. obliquus</i> , C= control, E= estrés	45
Figura 18. A) <i>S. obliquus</i> al inicio de la limitación de nutrientes. B) <i>Desmodemus</i> spp. al inicio de la limitación de nutrientes. C) <i>S. obliquus</i> al final de la fase con <i>Nannochloropsis</i> . D) <i>Desmodemus</i> spp. al final de la fase con <i>Nannochloropsis</i>	46
Figura 19. Abundancia relativa de los ácidos grasos presentes en los cultivos de <i>Desmodemus</i> spp. al inicio y al final de la fase de estrés. D= <i>Desmodemus</i> spp., C= control, E= estrés, I= inicial, F= final	48
Figura 20. Abundancia relativa de los ácidos grasos presentes en los cultivos de <i>S. obliquus</i> al inicio y al final de la fase de estrés. S= <i>S. obliquus</i> , C= control, E= estrés, I= inicial, F= final	48
Figura 21. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en los cultivos de <i>Desmodemus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> al inicio y al final de la fase de estrés. D= <i>Desmodemus</i> spp., S= <i>S. obliquus</i> , C= control, E= estrés, I= inicial, F=final	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estrategias de cultivo para incrementar lípidos y carbohidratos en las Microalgas	17
Tabla 2. Métodos analíticos para la determinación de los parámetros del agua residual y el lixiviado	22
Tabla 3. Condiciones estudiadas de los tres porcentajes de lixiviado	24
Tabla 4. Características fisicoquímicas promedio del agua residual y el lixiviado	31
Tabla 5. Remoción de nutrientes por las microalgas	33
Tabla 6. Características fisicoquímicas promedio de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> al inicio de la curva de crecimiento	37
Tabla 7. Características fisicoquímicas promedio de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> al final de la curva de crecimiento	38
Tabla 8. Porcentaje de remoción de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i>	39
Tabla 9. Porcentaje de remoción de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> con lixiviado al 7%	39
Tabla 10. Biomasa y productividades de los cultivos de <i>Desmodesmus</i> spp. y <i>S. obliquus</i> con los tres diferentes porcentajes de lixiviado	41
Tabla 11. Perfil de ácidos grasos y abundancia relativa de <i>Desmodesmus</i> spp. <i>S. obliquus</i> al inicio y al final de la fase de limitación de nutrientes	47

## RESUMEN

Las microalgas son capaces de crecer en agua residual, utilizando ésta como una fuente de nutrientes, por lo que al asimilar dichos nutrientes, los remueve del agua y al mismo tiempo se puede producir biomasa microalgal la cual puede ser utilizada para una producción potencial de biocombustibles. El lixiviado de relleno sanitario es otra alternativa como fuente de nutrientes para el cultivo de las microalgas, que no ha sido estudiada ampliamente, no obstante tiene las mismas ventajas económicas y ambientales que el agua residual. En este trabajo se investigó el uso de una mezcla de agua residual y lixiviado de relleno sanitario para el cultivo de microalgas y la remoción de nutrientes, seguido de una fase de limitación de nutrientes para la acumulación de lípidos y carbohidratos. Las microalgas utilizadas fueron *Scenedesmus obliquus* proveniente de un cultivo previamente adaptado a agua residual, y *Desmodesmus* spp. proveniente del lago Nabor Carrillo ubicado en Texcoco, México. Las microalgas fueron cultivadas en una mezcla de agua residual y diferentes proporciones de lixiviado (15,10, 7%). En estos cultivos se evaluó tanto la remoción de nutrientes como la producción de biomasa. Debido a que la máxima concentración de biomasa se obtuvo con agua residual y 7% de lixiviado, estos cultivos se sometieron a limitación de nutrientes, los cuales inicialmente se dejaron sedimentar durante 5 días, después se retiró el sobrenadante para posteriormente agregar agua residual diluida al 50% con agua destilada. En esta fase de limitación de nutrientes se cuantificaron los carbohidratos, los lípidos y la concentración de biomasa dos veces por semana. Adicionalmente, en cada fase se observaron cambios morfológicos en ambas microalgas. Se determinó que la concentración de biomasa final obtenida utilizando 7% de lixiviado fue de 1.26 g/L para *Desmodesmus* spp y 1.18 g/L para *S. obliquus*. Respecto a la remoción de nutrientes, se determinó una remoción de nitrógeno total de 80%, así como del 40% para el caso de ortofosfatos, para ambas microalgas. Durante la fase de limitación de nutrientes, los cultivos de microalgas continuaron en crecimiento, obteniéndose una concentración final de biomasa de 1.75 g/L para *S. obliquus* y 1.95 g/L para *Desmodesmus* spp., este último, comparado con *S. obliquus*, acumuló el contenido más alto de lípidos (20%) y carbohidratos (41%). Bajo estas condiciones de estudio se obtuvo el perfil de ácidos grasos para ambas microalgas, determinándose un incremento de ácidos grasos poliinsaturados después de la fase de limitación de nutrientes. A partir de estos resultados se concluye lo siguiente: a) ambas microalgas son eficientes para el tratamiento de agua residual y lixiviado; b) mediante la estrategia de cultivo en dos fases, es posible incrementar la concentración de biomasa y el contenido de lípidos y carbohidratos; c) las concentraciones de nitrógeno

tienen efecto en la morfología de la célula; y d) la limitación de nutrientes induce cambios en el perfil de ácidos grasos.

## ABSTRACT

Because of microalgae are able to grow in wastewater by removing nutrients and also produce biofuels, landfill leachate is another option as a nutrient source for microalgae cultivation and has not been extensively investigated despite it has the same economical and environmental advantages that wastewater. In this study, the use of wastewater mixed with landfill leachate for microalgae cultivation and nutrient removal, followed by a nutrient limitation phase (stress) for carbohydrates and lipids accumulation was investigated. The microalgae used were *Scenedesmus obliquus* coming from a previous culture adapted to wastewater, and a *Desmodesmus* spp. consortium from Nabor Carrillo Lake, located in Texcoco, Mexico. The microalgae were cultivated in a mixture of municipal wastewater and different ratios of landfill leachate (15, 10, 7%), in these cultures, the nutrient removal was evaluated. The maximum biomass concentration was obtained with raw wastewater and 7% of leachate so these cultures were subjected to physiological stress. First the cultures were settle, then the supernatant was drained and wastewater diluted with distilled water was added. In this stress phase carbohydrates, lipids, and biomass concentration were quantified twice a week. Furthermore, morphological changes were observed in both microalgae. The final biomass concentration obtained with 7% of leachate was 1.18 g/L for *S. obliquus* and 1.26 g/L for *Desmodesmus* spp. The total nitrogen removal was 80% and 40% in the case of orthophosphates. During the limitation phase the microalgae still growing obtaining a final biomass concentration of 1.75 g/L for *S. obliquus* and 1.95 g/L for *Desmodesmus* spp., this consortium, compared with *S. obliquus*, accumulated the highest lipids (20%) and carbohydrates content (41%). Finally, the fatty acid profile was carried out for both microalgae, obtaining that the polyunsaturated fatty acid increased after stress phase. From these results several conclusions can be made: a) both microalgae are effective for wastewater and leachate treatment; b) by employing the cultivation strategy in two phases, it is possible to increase biomass concentration and lipids, and carbohydrates content; c) the nitrogen concentrations in the cultures have effect on cell morphology; and d) nutrient limitation induce changes in the fatty acid profile.

## 1. INTRODUCCION

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares que pueden ser procariontes o eucariontes y se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres o en el suelo, y bajo amplios intervalos de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes; son responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Tienen una gran diversidad y se clasifican de acuerdo a su pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verde, las diatomeas y las cianobacterias (Sheehan *et al.* 1998; Garibay *et al.* 2009; Johansen, 2012).

Durante las últimas décadas ha surgido el interés en el cultivo de microalgas debido a su capacidad para combatir el efecto invernadero, ya que contribuyen de manera importante en la fijación de CO<sub>2</sub>; para la obtención de productos con valor nutricional, químico, farmacéutico, industrial entre otros, y principalmente como fuente alternativa de energía, como la producción de biocombustibles considerada actualmente como una de las vías más prometedoras. La demanda de esta última ha surgido debido a problemáticas como el incremento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles y el calentamiento global (causado por gases de invernadero) (Gómez, 2007; Val, 2009; Garibay, 2009; Ji *et al.* 2014).

Para la producción de biocombustibles, como el biodiesel, existen diferentes fuentes de aceites vegetales y animales, de dichas fuentes las microalgas son consideradas las de mayor potencial, ya que ofrecen varias ventajas tales como: crecimiento muy rápido; fijación del CO<sub>2</sub> ambiental, ya que lo pueden utilizar como fuente de carbono para su crecimiento; no son dependientes de un suelo fértil por lo que no comprometen la producción de alimentos; pueden acumular lípidos bajo condiciones ambientales desfavorables; además son flexibles ante el tipo y la calidad de agua que puede utilizarse para su crecimiento, ya que pueden crecer en aguas marinas, dulces, salobres e incluso aguas residuales (Chisti, 2007; Garibay, 2009; Gerardo *et al.* 2014).

La biomasa y el contenido lipídico de las microalgas pueden ser manipulados en función de las condiciones de cultivo, que pueden ser tanto estímulos químicos como físicos. Los principales estímulos químicos son la concentración de nutrientes, la salinidad y el pH del medio de cultivo, los físicos son la temperatura, la intensidad luminosa y la agitación ya sea mecánica o mediante aireación (Loera, 2010). Cuando las condiciones de cultivo cambian,



las microalgas son sometidas a estrés fisiológico provocando la síntesis y acumulación de lípidos y carbohidratos. El factor que más afecta el metabolismo de estas biomoléculas es la limitación de nutrientes, principalmente de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Bertoldi *et al.* 2006; Rodolfi *et al.* 2009; Loera-Quezada y Olguín, 2010; Xin *et al.* 2010; Pancha *et al.* 2014). La acumulación de lípidos y carbohidratos puede ser mayor si, sumado a la limitación de N y P, hay disponibilidad de carbono (Prathima *et al.* 2011; Chandra *et al.* 2014), por ejemplo, adicionando CO<sub>2</sub> cuando el cultivo tiene tal limitación de nutrientes, lo cual provee ventajas adicionales a la producción de biocombustibles ya que esto puede ayudar a la mitigación del CO<sub>2</sub> ambiental (Mata *et al.* 2012; Razzak *et al.* 2013; Laurens 2014; Pancha *et al.* 2014).

Debido a que la mayor fuente de nutrientes que influyen el crecimiento celular de las microalgas son N y P, integrar el uso de aguas residuales como medio de cultivo con la producción simultánea de biocombustibles, es una alternativa bastante prometedora y ambientalmente sustentable debido a que por un lado se puede obtener biomasa microalgal, ya que el agua residual es rica en estos elementos (N y P), y por otro lado estos microorganismos al eliminar los nutrientes del agua residual, ésta obtiene una mejor calidad (Olguin, 2003; Larsdotter, 2006; Loera-Quezada y Olguín 2010; Tian-Yuan *et al.* 2014; Gerardo *et al.* 2014). Los trabajos publicados enfocados en cultivo de microalgas en agua residual, lo han hecho utilizando agua municipal, industrial y agrícola por lo que las concentraciones de N y P pueden variar. Otra fuente alterna de nutrientes con ventajas económicas y ambientales similares es el lixiviado de rellenos sanitarios el cual se define como un líquido que ha pasado lentamente a través de los desechos llevándose a su paso microorganismos, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, además contiene altas concentraciones de nitrógeno (1000-5000 mg/L) así como de fósforo y otros elementos. Las altas concentraciones de amonio que tienen los lixiviados pueden persistir con el tiempo en dicho desecho y por lo tanto pueden ocasionar un efecto deletéreo al ambiente por lo que deben ser contenidos y tratados. En este contexto, el uso de microalgas puede ser un método viable para el tratamiento de lixiviados, y a pesar de que puede resultar tóxico para tales microorganismos, se puede reducir la toxicidad del amonio presente en el lixiviado mediante su dilución (Zhao *et al.* 2014; Nie *et al.* 2015; Sforza *et al.* 2015).

Se ha prestado poca atención al cultivo de microalgas en lixiviado de relleno sanitario y la producción simultánea de biomasa con alto contenido en lípidos y carbohidratos, dado que este residuo es altamente contaminante y puede ocasionar daños tanto al ambiente como a la salud humana, investigar el uso de este desecho junto con el agua residual como

principal fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas y así mismo implementar una estrategia de cultivo en dos fases para generar tanto biomasa como lípidos y carbohidratos, podría ser de gran importancia para la biorremediación de dichos desechos y al mismo tiempo aprovechar la biomasa para la producción simultánea de biocombustibles. Por lo que se propone cultivar *Scenedesmus obliquus* y *Desmodesmus* spp. sometiéndolas a una fase de crecimiento, utilizando como medio de cultivo una mezcla de agua residual y lixiviado, a diferentes concentraciones, seguida de una fase de limitación de nutrientes, permitiendo seleccionar las mejores condiciones de cultivo que generen tanto grandes cantidades de biomasa como de lípidos y carbohidratos para la producción potencial de biocombustibles. Así mismo se evaluará la remoción de nutrientes de la mezcla de agua residual y lixiviado, así como el efecto de la limitación de nutrientes en el perfil de los metil ésteres de los ácidos grasos (Fatty Acids Methyl Esters, por sus siglas en inglés FAME).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Microalgas. Generalidades

Las microalgas representan un grupo diverso de microorganismos los cuales tienen pigmentos fotosintéticos como clorofila a, b y c, carotenos y ficobilinas. Pueden tener diferentes tipos de organización celular tales como unicelular, colonial y filamentoso, y también un amplio intervalo de tamaños y formas. Son microorganismos que pueden encontrarse en diversos hábitats ecológicos como agua dulce, marina, salobre, así también en el suelo, en rocas, en desiertos, pantanos, aguas termales o en asociaciones con otros organismos como los líquenes. Actualmente se han identificado alrededor de 40,000 especies, sin embargo, se estima que existen más de 100,000 y se clasifican en las siguientes 10 divisiones: Cyanophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, y Chlorophyta. Son los productores primarios de la cadena alimenticia ya que producen materia orgánica a partir de la luz del sol, dióxido de carbono y agua, además de generar oxígeno (Barsanti y Gualtieri, 2006; Lee, 2008; Hu *et al.* 2008).

### 2.2 Aplicaciones e importancia biotecnológica

Las microalgas se han utilizado desde la antigüedad como alimento, sin embargo, durante las últimas décadas han sido el foco de atención para la investigación debido a su potencial biotecnológico, lo cual se basa en el cultivo masivo de estos microorganismos y la recuperación de productos de alto valor a partir de la biomasa generada, identificando la cepa de interés, el compuesto que produce y bajo qué condiciones de cultivo lo acumula, como por ejemplo la intensidad luminosa, el fotoperiodo, la temperatura, el pH, la agitación y la composición del medio (Olaizola, 2003; Bertoldi *et al.* 2008).

Las microalgas son capaces de producir diversos compuestos y productos bioquímicos originados de su metabolismo celular, tales como pigmentos (clorofilas, carotenoides, ficobilinas), sustancias de reserva (almidones, ácidos grasos, esteroides, hidrocarburos, fructanos), polímeros (peptidoglicano, mucílago celulosa) y metabolitos secundarios (antibióticos, neurotoxinas) (Cardozo *et al.* 2007). Esta amplia gama de compuestos generados a partir de las microalgas, son de importancia para el ser humano porque pueden tener aplicaciones bioquímicas y por lo tanto comerciales, haciéndolas una gran fuente de productos de valor agregado como: nutraceuticos ya que pueden ser utilizadas para

incrementar el valor nutricional de los alimentos para humanos y animales, antioxidantes, farmacéuticos, sustancias para uso industrial como pigmentos, agentes terapéuticos, biofertilizantes, pueden ser incorporadas en los cosméticos y también se pueden utilizar las microalgas en la acuicultura como alimento (Spolaore *et al.* 2006, Gómez, 2007).

Además estos microorganismos fotosintéticos también pueden ser utilizados para biorremediación ya que pueden crecer en agua residual, aunado a esto, el nitrógeno, al ser su principal fuente de nutrientes, permite que se pueda utilizar el lixiviado como otra alternativa de medio de cultivo, debido a que presenta altas cantidades de este elemento (N), por lo tanto las microalgas al absorber los nutrientes tanto del agua residual como del lixiviado, los remueve, obteniéndose una mejor calidad de estos residuos, y al mismo tiempo la biomasa generada en estos contaminantes, puede utilizarse para producir biocombustibles, sumándole la ventaja de que el cultivo puede ayudar a mitigar el CO<sub>2</sub> (Razzak *et al.* 2013).

### **2.3 Problemática de aguas residuales**

Las actividades antropogénicas han tenido un gran impacto en el incremento de descargas de aguas residuales, en México solo se tratan el 52.7% del total de aguas residuales municipales que son generadas en el país (CONAGUA 2014). Por lo que parte del agua residual llega a cuerpos de agua receptores, y al ser descargada sin ningún tratamiento tiene efectos adversos sobre los ecosistemas ya que tienen altos contenidos de materia orgánica y nutrientes, principalmente de nitrógeno (N) y fósforo (P), disminuyendo la posibilidad de que sean reusadas, ocasionando problemas de contaminación y eutrofización, teniendo como consecuencia la pérdida de especies naturales y por lo tanto la reducción de la biodiversidad, el reemplazo de las especies dominantes, incremento de la toxicidad del agua y de la turbidez y por lo tanto la pérdida de la función de un ecosistema. Por ello se requiere darle un tratamiento a las aguas residuales el cual comprende los siguientes procesos: tratamiento primario, el cual consiste en la separación de sólidos por sedimentación, flotación y/o neutralización; tratamiento secundario el cual es un proceso aerobio o anaerobio en el que ocurren la mayoría de las actividades de depuración de materia orgánica a través de lagunas de estabilización, de lodos activados y/o de filtros biológicos y otros como son los digestores anaerobios. Este último en la mayoría de los casos contiene elevadas concentraciones de N y P, por lo que se requiere darle un tratamiento terciario con procesos fisicoquímicos como la precipitación, el intercambio iónico, remoción de nutrientes, de metales pesados, cloración, ozonización y ósmosis

inversa, resultando muy costosos y por lo tanto restringiéndose su utilización o no implementándose (Salazar, 2006; Aslan y Kapdan, 2006; Alvarado, 2012; Cai *et al.* 2013). Aparte de los tratamientos terciarios mencionados anteriormente, hay otros procesos de remoción de nutrientes como los humedales y los sistemas hidropónicos. En estos sistemas de tratamiento principalmente se asimilan los nutrientes en la biomasa vegetal (Larsdotter, 2006).

Debido a esto se ha hecho una amplia investigación en cuanto a la remoción de N y P de aguas residuales, resultando como solución el uso de microalgas, el cual es ambientalmente sustentable que otras formas de tratamiento, debido a que hay una utilización y transformación de los nutrientes a biomasa, se incrementa el pH por el proceso fotosintético, favoreciendo la precipitación de ortofosfatos y la eliminación de nitrógeno amoniacal por efecto de intercambio gaseoso, hay una producción consecuente de oxígeno, favoreciendo la degradación continua de la materia orgánica por lo que finalmente se mejora la calidad del efluente, además de que no se generan contaminantes adicionales, si se hace uso de la biomasa generada (Kojima y Lee, 2001; Salazar, 2006; Pittman *et al.* 2011; Lee *et al.* 2013).

## **2.4 Problemática de los lixiviados de rellenos sanitarios**

La generación de residuos sólidos urbanos (RSU) o municipales es un tema de interés ya que va en aumento y se estima que en México hay un incremento de casi 1 millón de toneladas cada año. En el 2011 se generaron alrededor de 41 millones de toneladas lo que equivale aproximadamente a 112.5 mil toneladas de RSU diariamente. Esto es resultado principalmente del crecimiento urbano, el desarrollo industrial, las modificaciones tecnológicas, el gasto de la población y el cambio en los patrones de consumo (SEMARNAT, 2012).

El relleno sanitario es uno de los métodos más empleados para la disposición final de los RSU y en México se emplea principalmente este método de confinamiento de los RSU (SEMARNAT, 2012). Una de las principales desventajas de los rellenos sanitarios, es la producción de un residuo acuoso denominado lixiviado, el cual se produce durante la descomposición de los residuos almacenados debido a la percolación del agua de lluvia a través de los residuos, sumándose a esto otros líquidos presentes en los residuos. El lixiviado resultante, presenta un color marrón o negro, desagradable olor, alta toxicidad y

elevada carga de materia orgánica, metales pesados, nitrógeno amoniacal y/o sales inorgánicas (Colomer y Gallardo, 2007; Vera, 2011).

De acuerdo a la NOM-083-SEMARNAT-2003, el lixiviado se define como el líquido que se forma por la reacción, arrastre o filtrado de los materiales que constituyen los residuos y que contiene en forma disuelta o en suspensión, sustancias que pueden infiltrarse en los suelos o escurrirse fuera de los sitios en los que se depositan los residuos y que puede dar lugar a la contaminación del suelo y de cuerpos de agua, provocando su deterioro y representar un riesgo potencial a la salud humana y de los demás organismos vivos. Debido a que representa un riesgo de contaminación tanto al ambiente como a la salud humana, es importante buscar alternativas viables de tratamiento que garantice una disminución de sus características altamente tóxicas. Se han realizado algunas investigaciones para explorar la eficacia de diferentes métodos de manejo y tratamiento de lixiviados incluyendo métodos de tratamiento aerobios o anaerobios (Ana-Maria y Maria, 2010; Kurniawan *et al.* 2010; Sunil *et al.* 2011), así mismo se ha estudiado el tratamiento de lixiviados mediante procesos biológicos como el uso de lodos activados, en donde los lixiviados son incorporados y tratados en los lodos en una relación lixiviado-agua residual de 1.5% (v/v) sin causar efectos negativos (Orta de Velásquez *et al.* 1999). En otro estudio se trataron los lixiviados por medio de lagunas facultativas, que con ayuda de la presencia de microalgas favorecieron la eficiencia de remoción sin alterar la población algal (Orta de Velásquez *et al.* 2006). Por lo que resulta como una alternativa viable, el uso de comunidades algales para el tratamiento de tales desechos.

## **2.5 Tratamiento del agua residual y el lixiviado mediante el uso de microalgas**

El tratamiento de aguas residuales utilizando microalgas para la remoción de nutrientes, se han estudiado por más de 50 años. Los primeros estudios fueron reportados por Caldwell (1946) y más tarde Oswald *et al.* (1957) utilizaron microalgas para el tratamiento de aguas residuales, obteniendo una producción de biomasa con un alto contenido proteico, demostrando que los cultivos a gran escala podrían ser simultáneamente utilizados para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa. Esto se convirtió en prioridad debido a que las descargas de dichos residuos en cuerpos de agua dulce y aguas costeras provocan la eutrofización de los mismos, ocasionando graves consecuencias sanitarias y ecológicas. Es conocido que varios sectores agroindustriales generan grandes volúmenes de aguas residuales con una alta concentración de amonio, así mismo también se generan grandes volúmenes de lixiviado de rellenos sanitarios con concentraciones aún más elevadas que pueden ir desde los 1000 hasta 5000 mg/L, además de otros elementos como

el fósforo y metales pesados, causando eutrofización, contaminación de aguas subterráneas, degradación del suelo etc. (Wiszniewski *et al.* 2006; Cai *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2014; Nie *et al.* 2015; Sforza *et al.* 2015). En este contexto, representa un reto el tratamiento de aguas residuales y lixiviados para la remoción de amonio, ya que es una de las tareas más difíciles de llevar a cabo durante los procesos de tratamiento. Así también, se ha demostrado que existen varias especies de microalgas que pueden asimilar tanto nutrientes del agua residual, como metales, por lo tanto otra alternativa como medio de cultivo para las microalgas es el uso de lixiviado. Sin embargo, existen pocas investigaciones con respecto a la utilización de dicho residuo tanto de manera individual como combinado con agua residual (Cheung *et al.* 1993; Lin *et al.* 2007; Elena *et al.* 2010).

Un reto al utilizar algas como una opción de remediación del lixiviado es la toxicidad de este, ya que se ha reportado que puede inhibir el crecimiento algal (Cheung *et al.* 1993; Lin *et al.* 2007). Sin embargo, esto puede resolverse mediante la dilución del lixiviado como lo reportan Mustafa *et al.* (2012); Zhao *et al.* (2014) y Sforza (2015).

El género de *Scenedesmus*, así como algunas especies de cianobacterias, se ha reportado para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales, de origen industrial y urbano. Además, tiene la capacidad de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno como nitratos, amonio y urea por lo que resulta ser un género adecuado para la remoción de nitrógeno inorgánico a partir de efluentes (De la Noue *et al.* 1992; Charity *et al.* 2009; Garofalo, 2009).

Por otro lado el género de *Desmodesmus* es cosmopolita y tiene la capacidad de resistir condiciones ambientales adversas como presiones de depredación, altas temperaturas, altas concentraciones de amonio, entre otras, por lo que también se ha reportado para el tratamiento de aguas residuales (Garofalo, 2009; Pan *et al.* 2011; Samori *et al.* 2013), sin embargo hay menos estudios ya que no era conocido el hecho de que el género de *Scenedesmus* había sido dividido en *Scenedesmus* y *Desmodesmus* por lo que parte de la literatura sobre *Scenedesmus* es posible que se refiera también a *Desmodesmus*.

### Remoción de Nutrientes

Las microalgas pueden llevar a cabo la remoción de nutrientes como el N y el P, de contaminantes orgánicos, de metales pesados y de patógenos del agua residual, debido a la capacidad que tienen para incorporar nutrientes dentro de la célula, como el N ya que lo utilizan para formar aminoácidos por medio de transaminación, ácidos nucleicos, clorofila y

otros componentes que contienen nitrógeno. Pueden incorporar el N a la célula en forma de amonio o nitrato, sin embargo, prefieren el amonio debido a que lo puede utilizar más directamente para la biosíntesis de aminoácidos. Así mismo incorporan fósforo en varias formas (De la Noüe *et al.* 1992; Contreras, 1994; Graham y Wilcox, 2000). Las microalgas absorben estos compuestos inorgánicos reduciendo la carga iónica y removiendo metales pesados por lo que funciona como un tratamiento biológico para aguas residuales de uso doméstico, industrial, agroindustrial y tratamiento de residuos agrícolas (Markou y Georgakakis, 2011; Raouf-Abdel *et al.* 2012). Esto ofrece ventajas como bajos costos de operación, la posibilidad de reciclar el N y el P asimilados en la biomasa de las microalgas y la descarga de efluentes oxigenados en los cuerpos de agua (Aslan y Kapdan 2006). Aunado a esto se ha reportado que pueden acumular ciertas biomoléculas de interés como por ejemplo lípidos (desde 10 hasta 30%) (Pittman *et al.* 2011) y carbohidratos incrementando las ventajas del cultivo de dichos microorganismos en agua residual ya que además de remover los nutrientes se puede utilizar la biomasa generada.

#### Interacción microalga-bacteria en el tratamiento de aguas residuales

Es importante mencionar que el tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas es un sistema complejo ya que el agua residual además de nutrientes, metales pesados y demás, cuenta con la presencia de bacterias que coexisten con las microalgas. Por un lado las microalgas proveen del O<sub>2</sub> necesario a las bacterias, éstas a su vez degradan contaminantes orgánicos y liberan CO<sub>2</sub> a partir de la respiración y este es utilizado por las microalgas como fuente de carbono en el proceso de fotosíntesis (Figura 1). Sin embargo, las interacciones entre estos microorganismos no se limitan sólo a este intercambio de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Las microalgas pueden tener un efecto tanto positivo como negativo sobre la comunidad bacteriana y viceversa. Por ejemplo las microalgas al incrementar el pH en el cultivo puede ser perjudicial para las bacterias así como la excreción de metabolitos inhibitorios (Oswald, 2003; Schumacher *et al.* 2003). Por otro lado, se han observado efectos positivos como lo reportaron Wolfaardt *et al.* (1994), trabajaron con un consorcio bacterias-microalgas para remover un componente activo de herbicidas comerciales (diclofop metilo), y observaron un incremento del 36% en la remoción de este compuesto por el consorcio, así mismo no se obtuvo tal remoción utilizando a las bacterias y microalgas por separado, concluyendo que es necesario la interacción entre el consorcio bacterias-microalgas para la remoción del diclofop. De igual manera el crecimiento bacteriano puede mejorar el metabolismo de las microalgas mediante la liberación de factores promotores del crecimiento o reduciendo la concentración de O<sub>2</sub> en el medio



(Mouget *et al.* 1995, Fukami *et al.* 1997; González y Bashan, 2000). También se ha reportado que pueden ayudar a mejorar la remoción de P y amonio o inhibir a las microalgas mediante la producción de metabolitos extracelulares con efecto alguicida (Fukami *et al.* 1997; De-Bashan *et al.* 2002).

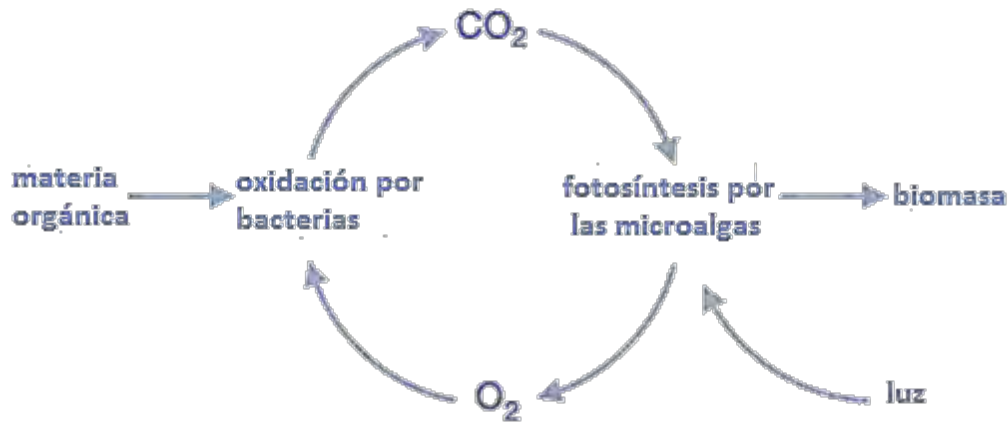


Figura 1. Intercambio de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> entre las microalgas y las bacterias. Modificado de Muñoz y Guieysse 2006.

## 2.6 Composición bioquímica de las microalgas

Las microalgas presentan un contenido de proteínas entre el 15-65% del peso seco, lípidos ricos en ácidos grasos, aproximadamente del 5-30% y la fracción restante se encuentra subdividida entre los carbohidratos (en algunas especies puede llegar hasta el 55% de la biomasa), las vitaminas y otras moléculas como carotenoides, clorofilas, aceites esenciales, hidrocarburos, glicerol, aminas y otros compuestos (Borowitzka, 1988; Sheehan *et al.* 1998).

### Proteínas

Las proteínas en las microalgas tienen funciones metabólicas y estructurales, son utilizadas como catalizadores enzimáticos del metabolismo celular por lo que facilitan el crecimiento; dentro de sus funciones intervienen en el ensamblaje de las moléculas de clorofila a los complejos de cloroplasto en donde se absorbe la luz y también se pueden encontrar inmersas en las membranas lipídicas como en el caso de las cianobacterias (Becker, 2007, Williams y Laurens, 2010).

## Carbohidratos

Los carbohidratos son productos derivados de la fotosíntesis y pueden ser precursoras en la síntesis de otras biomoléculas como por ejemplo los lípidos. El contenido de estos puede variar ampliamente, entre el 10 y el 50% aproximadamente, dependiendo tanto de las condiciones de cultivo como de la especie, sin embargo, estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación de nutrientes junto con los lípidos (Granum *et al.* 2002). Su composición puede variar entre las especies de microalgas, los azúcares principales son glucosa, galactosa, manosa y ribosa, generalmente la glucosa se encuentra en concentraciones mayores. Los azúcares pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Existen diferencias en la naturaleza de los polisacáridos encontrados en los diferentes grupos de microalgas (Whyte, 1987; Brown *et al.* 1989; Becker, 2007). Estos a su vez se dividen en estructurales y de reserva: los primeros se encuentran como componentes principales de las paredes celulares y los segundos se acumulan principalmente en los cloroplastos, con tasas de acumulación mayores en condiciones de estrés (Geider y La Roche, 2002). En el caso de las algas verdes, los carbohidratos que se encuentran en la pared son principalmente celulosa, hemicelulosa y polisacáridos solubles (Domozych *et al.* 2012); y el que se encuentra como sustancia de reserva es el almidón, que está conformado por amilosa y amilopectina los cuales son compuestos similares a los de las plantas superiores (Williams y Laurens, 2010). Tanto el almidón como la mayoría de los carbohidratos de la pared celular pueden ser convertidos en azúcares fermentables para producir bioetanol mediante un proceso de fermentación por lo que resulta de gran importancia seleccionar microalgas con alto contenido de carbohidratos y cuya composición de azúcares sea la adecuada para utilizarlas como materia prima para una producción factible de dicho biocombustible (Chen *et al.* 2013). *S. obliquus* es una especie que tiene potencial para la producción de bioetanol debido a su contenido de carbohidratos ya que se ha logrado alcanzar hasta 51.8% en condiciones de estrés (Ho *et al.* 2012).

Las rutas metabólicas para la síntesis de biomoléculas con alto valor energético (carbohidratos y lípidos) están estrechamente relacionadas, ya que primero se sintetiza como sustancia de reserva el almidón, después de un tiempo prolongado de estrés, se empieza a degradar este carbohidrato mediante el proceso de glucólisis y los productos resultantes son precursores de la síntesis de lípidos (Breuer *et al.* 2012; Ho *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013).

Para mejorar la producción de biocombustibles, ya sea de bioetanol a partir de carbohidratos, o biodiesel a partir de lípidos, es de gran importancia comprender el metabolismo de estas biomoléculas en las microalgas y cómo los factores ambientales afectan la síntesis de dichos compuestos, de tal manera que puedan ser manipulados mediante diferentes estrategias de cultivo y así mismo lograr una alta acumulación de estas moléculas energéticas para ser aprovechadas para la producción de biocombustibles. También hay autores que proponen manipular mediante ingeniería genética el metabolismo tanto de carbohidratos como de lípidos.

### Lípidos

Los lípidos de las microalgas también tienen funciones estructurales y de reserva de energía, su composición varía considerablemente de acuerdo a la especie y las condiciones de cultivo ya que se ha observado que en cultivos donde se ha suprimido la fuente de nitrógeno se ha logrado obtener un incremento de hasta tres veces la concentración normal de lípidos (Qiang *et al.* 2008).

Estos pueden dividirse en dos grupos principales los lípidos polares (como glicolípidos y fosfolípidos) y los neutros (como los triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, etc.). Los primeros se encuentran en la membrana y los niveles de saturación de estos ácidos grasos determinan la fluidez de la misma bajo diferentes condiciones ambientales, predominando los ácidos grasos insaturados. Por otro lado, los triglicéridos son importantes reservas de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los ácidos grasos constituyen la mayor fracción de lípidos llegando hasta el 80% del total de lípidos en microalgas y estos pueden variar de acuerdo a la especie y a las condiciones de cultivo. Las microalgas pueden adaptarse rápidamente a cambios ambientales mediante la síntesis *de novo* de ácidos grasos para mantener las características de la membrana. La mayoría de los ácidos grasos encontrados en las microalgas son moléculas de cadena recta con número par de átomos de carbono, dentro de estos ácidos grasos se encuentran los de cadena media (C10-C14), los de cadena larga (C16-C18) y los de cadena muy larga ( $\geq 20$ ), además éstos pueden ser saturados, insaturados o poliinsaturados. La insaturación es importante para determinar la calidad del biodiesel ya que afecta sus propiedades. En las microalgas verdes se presentan bajas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados (5-20%) y altas concentraciones de poliinsaturados (50-80%) (Watanabe *et al.* 1983; Brown *et al.* 1989; Chisti, 2007; Barranza *et al.* 2009; Williams y Laurens, 2010).

## 2.7 Factores que influyen en la composición bioquímica y el crecimiento

Los compuestos químicos que producen las microalgas a partir de su metabolismo cumplen un rol ecológico importante mediando la interacción de la microalga con su ambiente, en respuesta a algún evento externo a las células microalgales que genere estrés fisiológico como lo sería la exposición a condiciones extremas de salinidad, temperatura, irradiancia y deficiencia de nutrientes. Dentro de estos compuestos químicos se encuentran los carbohidratos y los lípidos, principalmente los ácidos triacilglicéridos (TAG), los cuales tienen una importancia biotecnológica debido a que a partir de ellos se pueden generar biocombustibles como el bioetanol y el biodiesel.

La síntesis y acumulación de TAG acompañada por una alteración considerable en la composición de lípidos (principalmente ácidos grasos) y carbohidratos, es causada por estrés fisiológico ya sea por estímulos químicos o físicos, actuando individualmente o en combinación (Hu *et al.* 2008; Rodolfi *et al.* 2009; Johansen, 2012; Chen *et al.* 2013).

Con respecto a los estímulos químicos, la limitación de nutrientes (principalmente N) es la que causa mayor impacto en la acumulación de lípidos y carbohidratos. El incremento de los lípidos, principalmente TAG, ocurre de dos formas por un lado hay un cambio en el metabolismo y en lugar de sintetizarse lípidos de membrana (que son los que predominan en condiciones favorables) se sintetizan lípidos neutrales de almacenamiento como los TAG; y por el otro lado algunos lípidos de membrana se convierten en TAG. Estos triacilglicéridos no juegan un papel estructural en la célula sino más bien funcionan como reserva de energía y fuente de carbono. Después de ser sintetizados estos compuestos en el cloroplasto, son depositados en cuerpos lipídicos localizados en el citoplasma de la célula (Hu *et al.* 2008).

Desafortunadamente al someter un cultivo a estrés fisiológico resulta en un bajo crecimiento celular lo que implica una baja productividad de biomasa, por lo que se busca mejorar el contenido de lípidos y carbohidratos sin comprometer el crecimiento celular y por consiguiente la biomasa (Pittman *et al.* 2011). Debido a esto se han estudiado diferentes estrategias de cultivo para incrementar los lípidos y carbohidratos sin comprometer la biomasa. Dentro de estas estrategias están la limitación total de nitrógeno, concentraciones intermedias de nitrógeno, la prolongación del tiempo de cultivo, la combinación de algunos parámetros fisicoquímicos como la intensidad de luz, salinidad, aireación con CO<sub>2</sub>, y por último el cultivo en dos fases, que consiste en una fase de crecimiento seguida por una fase de limitación de nutrientes, esto se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Estrategias de cultivo para incrementar lípidos y carbohidratos en las microalgas.

Microalga	Medio de cultivo	Biomasa g/L	Lípidos %	Carbohidratos %	Estrategia de cultivo	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual hidropónica	—	17.41	—	Limitación de nutrientes mediante dilución del agua residual	Bertoldi et al. 2006
<i>Desmodesmus sp.</i>	Bold modificado	—	58	—	Limitación total de nitrógeno	Pan et al. 2011
<i>S. obliquus</i>	Medio Detmer modificado	4.9	22.4	51.8	Limitación total de nitrógeno e intensidad luminosa	Ho et al. 2012
<i>Chlorella minutissima</i>	Tamiya	2.7	30	—	Concentraciones intermedias de nitrógeno	Ördög et al. 2012
<i>S. obliquus</i>	Chu 13 modificado	—	36	—	estrés salino	Pakawadee et al. 2012
<i>Desmodesmus sp.</i>	Bold basal modificado	0.93	19.7	—	Fotobioreactor, iluminación continua y CO <sub>2</sub>	Wu et al. 2012
<i>Desmodesmus communis</i>	Agua residual	1.4	—	50	Cultivo con alta intensidad luminosa y aireado con CO <sub>2</sub>	Samori et al. 2013
<i>Scenedesmus sp.</i>	BG-11	0.426	20	28.1	Dos fases	Pancha et al. 2014
<i>Desmodesmus abundans</i>	BG 11	—	39.1	—	Dos fases, la segunda con estrés salino	Xia et al. 2014
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agua residual con lixiviado	1.58	20.8	—	ninguna	Zaho et al. 2014
<i>S. obliquus</i>	Agua residual	1.03	49	—	Dos fases (limitación total de nitrógeno con CO <sub>2</sub> , salinidad y luz)	Álvarez et al. 2015

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El uso de las microalgas ofrece diferentes opciones para resolver problemas ambientales como es el caso del agua residual y el lixiviado, que son residuos altamente contaminantes que pueden ocasionar efectos deletéreos al ambiente, o por otra parte el constante aumento en la demanda de energía que así mismo genera un impacto negativo al ambiente. En este contexto las microalgas tienen gran potencial ya que pueden generar efluentes limpios y a su vez producir altas cantidades de biomasa que pueden ser aprovechables para la generación potencial de bioenergía como los biocombustibles tales como el biodiesel o el bioetanol. Por lo que es importante fomentar el desarrollo de una investigación que de paso a integrar el tratamiento de aguas residuales y lixiviados junto con el aprovechamiento de la biomasa generada, tomando en cuenta las condiciones de cultivo, el crecimiento y el conocimiento que se ha generado con respecto a las microalgas, con el fin de producir biomasa de alto valor agregado que de paso a la producción potencial de biocombustibles.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (limitación de nutrientes) en la composición bioquímica y producción de biomasa de un consorcio de microalgas cultivadas en una mezcla de agua residual y lixiviado, para la producción potencial de biocombustibles.

### Objetivos particulares

1. Determinar las especies de microalgas presentes en los cultivos a utilizar, para la producción potencial de biocombustibles.
2. Determinar el porcentaje de lixiviado a utilizar para el cultivo de microalgas.
3. Determinar los parámetros fisicoquímicos (SST, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, ortofosfatos, alcalinidad y DQO) de la mezcla de agua residual con lixiviado para evaluar la remoción de nutrientes.
4. Evaluar la limitación de nutrientes y su efecto sobre la composición de lípidos y carbohidratos, así como el perfil de ácidos grasos para la producción potencial de biocombustibles.

## 5. HIPÓTESIS

La manipulación de las condiciones de cultivo, como la cantidad de nitrógeno y fósforo presente en el medio, provocará cambios en el crecimiento poblacional y en el contenido de lípidos y carbohidratos de las microalgas *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp., permitiendo la selección de las condiciones que favorezcan una mayor producción de biomasa, lípidos y carbohidratos que puedan ser aprovechados para la producción potencial de biocombustibles.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) con registro RSGC 960 de fecha 11 de enero de 2016, vigente al 11 de enero de 2019, y se encuentra ubicado en el Instituto de Ingeniería de la UNAM. La determinación de las especies de microalgas se llevó a cabo en el Laboratorio de Algas continentales Ecología y taxonomía ubicado en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La metodología de este trabajo de investigación se muestra resumida en el diagrama de la Figura 2. En los siguientes apartados se hace una descripción de los aspectos más importantes de la metodología y procedimientos analíticos que se utilizaron en el estudio.

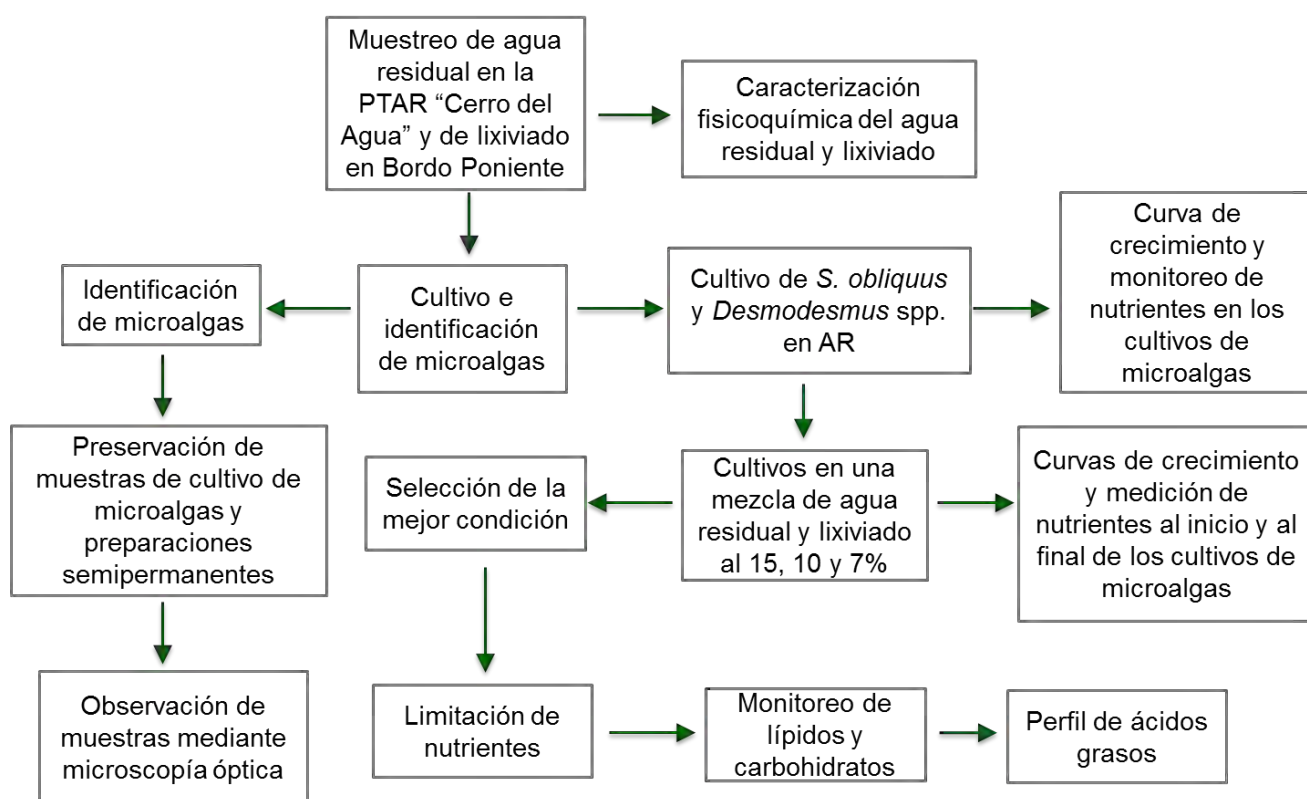


Figura 2. Diagrama general de la metodología



### 6.1 Muestreo de agua residual y lixiviado

Se llevó a cabo la toma de muestra de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Cerro del Agua ubicada en Ciudad Universitaria (UNAM), la muestra de lixiviado se obtuvo de la etapa III del relleno sanitario Bordo Poniente de la Ciudad de México ubicado en la zona Federal del ex-lago de Texcoco, se colectó una única muestra en el mes de octubre de 2015. El punto de muestreo fue en el cárcamo de almacenamiento de la planta de lixiviados y se muestra en la Figura 3. Con respecto a la PTAR de Cerro del Agua se colectaron 5 muestras una por cada mes en los siguientes meses, abril de 2015, octubre, noviembre y diciembre de 2015 y febrero de 2016. Tanto las muestras de lixiviado como de agua residual fueron colectadas en bidones de polietileno de 20 L. Estas muestras al ser el medio de cultivo para las microalgas fueron sometidas a un proceso de filtrado rápido para retirar los sólidos, esto se hizo utilizando nube espuma y conos de imhoff. Posteriormente el agua residual se filtró de nuevo pero al vacío con papel filtro Whatman número 40, el cual tiene un diámetro de poro de 8  $\mu\text{m}$ , y el lixiviado se filtró utilizando filtros GF/A Whatman que tienen un tamaño de poro de 1.6  $\mu\text{m}$ ; posterior a esto se almacenó en un cuarto frío a 4°C.



Figura 3. Punto de muestreo de lixiviados de etapa III del relleno sanitario Bordo Poniente. Fotos de la autora.

### 6.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos del agua residual y del lixiviado

Se determinaron los parámetros fisicoquímicos del agua residual y del lixiviado como pH, alcalinidad, demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendido totales como biomasa seca en mg/L (SST), conductividad eléctrica, ortofosfatos, nitratos, nitrógeno amoniacal con el equipo Büchi Distillation Unit B-324 y el nitrógeno total mediante el equipo TOC-L<sub>CPH/CPN</sub> (Tabla 2).

Tabla 2. Métodos analíticos para la determinación de los parámetros del agua residual y el lixiviado.

Parámetro	Método analítico	Técnica de la determinación
pH	*Método electrométrico 4500 HB	Medición directa con potenciómetro
Sólidos suspendidos totales	*Método 2540 D	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 105°C
Conductividad eléctrica	*Método 2510 B	Medición directa con el conductímetro
Alcalinidad total como CaCO <sub>3</sub>	*Método 2320 B	Titulométrico. Medición de pH hasta 4.5 titulando con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N
Ortofosfatos	Método 8178 HACH	Colorimétrico. Medición en espectrofotómetro a 530 nm
Nitrógeno amoniacal	*Método titulométrico 4500 NH <sub>3</sub> E	Destilación con NaOH y posterior titulación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.02N
Demanda química de oxígeno	Método 8000 HACH	Colorimétrico. Digestión por 2 h y posterior lectura en espectrofotómetro a 620 nm
Nitrógeno total	Combustión oxidativa-quimioluminiscencia	Medición con el equipo TOC-L <sub>CPH/CPN</sub>
Nitratos	Método 8039 HACH	Colorimétrico. Medición en espectrofotómetro a 500 nm

\*Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA 1992)

Para la determinación del nitrógeno total primero se hizo una curva de calibración con nitrato de potasio, en la cual la concentración de nitrógeno de la solución fue de 1000mgN/L (equivalente a 1000 ppmN), la curva se hizo en un intervalo de 0 a 100 mg/L. Posterior a esto se llevó a cabo la preparación de las muestras para ser analizadas con el equipo TOC-L<sub>CPH/CPN</sub> Shimadzu.

### **6.3 Cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* en agua residual**

Se obtuvieron cultivos de *Desmodesmus* spp. proveniente del lago Nabor Carrillo el cual es un lago artificial alimentado por el efluente de las lagunas facultativas de la planta de tratamiento de agua residual ubicada en Texcoco, México. El cultivo de *Scenedesmus obliquus* se obtuvo a partir de una cepa ya identificada previamente adaptada a agua residual. Los cultivos se iniciaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales se fueron escalando, utilizando como medio de cultivo sólo agua residual, hasta llegar a un volumen de 10 L de cada uno de los cultivos (cultivos madre). Estos cultivos se mantuvieron con agitación manual (de 2 a 3 veces por día), e iluminación con fotoperiodos de luz y oscuridad 12:12.

### **6.4 Determinación de las especies de *Desmodesmus* spp.**

Para la determinación taxonómica de *Desmodesmus* spp., se tomaron 10 mL del cultivo madre y se preservaron con formol al 3% para posteriormente hacer preparaciones semipermanentes con gelatina glicerinada (González y Novelo 1986 modificada) por triplicado, estas preparaciones fueron observadas en el microscopio óptico a 100x, para llevar a cabo la determinación de las especies solo se tomaron en cuenta los caracteres morfológicos como el arreglo del cenobio, la forma y el tamaño de las células, la forma y el arreglo de las espinas y la presencia de otras ornamentaciones (Figura4). Se utilizaron las claves taxonómicas de Hindák (1990) y Hegewald y Silva (1988). Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Algas continentales Ecología y taxonomía en la Facultad de Ciencias-UNAM.

#### *Remoción de nutrientes en agua residual y crecimiento de los cultivos*

A partir de estos cultivos madre se tomó inóculo y se montaron 4 cultivos (2 de cada género), en contenedores de polietileno (polyethylene terephthalate, por sus siglas en inglés PET) con capacidad de 4 L, obteniéndose un volumen de 3.8 L (30% de inóculo y 70% de agua residual) por cada cultivo. En estos cultivos se estimó el crecimiento mediante la obtención de curvas durante 28 días, midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 680 nm y también se determinó la concentración de biomasa seca medida como mgSST/L (Arredondo y Voltolina, 2007; Chen *et al.* 2011). Así mismo se llevó a cabo el monitoreo de los nutrientes de los cultivos en agua residual de la siguiente manera: de cada cultivo se tomaron 100 mL, los cuales fueron centrifugados a 5000 rpm, después el sobrenadante se filtró al vacío con papel filtro Whatman GF/A. Se recuperó la biomasa, se

secó y se guardó para su posterior análisis de lípidos y carbohidratos. Del filtrado se midieron los nitratos, los ortofosfatos, el nitrógeno amoniacal y el nitrógeno total mediante las técnicas anteriormente mencionadas. Esto se hizo tres veces por semana durante 28 días.

## 6.5 Cultivo de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* en una mezcla de agua residual y lixiviado

### Fase 1: Fase de crecimiento

Las microalgas se cultivaron en una mezcla de agua residual y tres diferentes proporciones de lixiviado: 15, 10 y 7%. Para cada una de las pruebas, se utilizaron cultivos de microalgas previamente acondicionados en agua residual, los cuales formaron parte de la proporción para cada una de las condiciones. Cabe mencionar que cada una de las pruebas se hizo por triplicado, trabajando por separado cada género, 3 biorreactores para cada uno. En la tabla 3 se describen las condiciones estudiadas.

Tabla 3. Condiciones estudiadas de los tres porcentajes de lixiviado.

CONDICIÓN	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN (%)
<b>Control</b>	agua residual-cultivo de microalgas	50:50
<b>Proporción 15%</b>	agua residual-cultivo de microalgas-lixiviado	50:35:15
<b>Proporción 10%</b>	agua residual-cultivo de microalgas-lixiviado	50:40:10
<b>Proporción 7%</b>	agua residual-cultivo de microalgas-lixiviado	50:43:7

Nota: Cada prueba se hizo por triplicado para cada género.

Es preciso indicar que las pruebas no se hicieron simultáneamente, primero se evaluó el crecimiento en la mezcla de agua residual y lixiviado al 15%, una vez determinada la curva de crecimiento se evaluó la condición con 10%, se obtuvo la curva de crecimiento; y finalmente se evaluó la condición con 7% de lixiviado con su respectiva curva de crecimiento. Para el caso de los cultivos en los que se utilizó lixiviado se observó una coloración más intensa debido al color de los lixiviados (Figura 4). Todos los cultivos se mantuvieron con agitación manual (de 2 a 3 veces por día), e iluminación con lámparas LED de luz blanca de 20W con fotoperiodos de luz y oscuridad 12:12.



Figura 4. a) Cultivos de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp. b) Cultivo en agua residual. c) Cultivo en la mezcla de agua residual y lixiviado al 15%

Para cada condición se determinó la remoción de nutrientes de la siguiente manera: de cada biorreactor se tomaron 150 mL, los cuales fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 min., después el sobrenadante se filtró al vacío con papel filtro Whatman GF/A. Del filtrado se midió la alcalinidad, DQO, ortofosfatos, nitratos, nitrógeno amoniacal y nitrógeno total mediante las técnicas anteriormente mencionadas. Esto se hizo al inicio y al final de la curva de crecimiento.

Así mismo para estimar el crecimiento de los cultivos se determinó la biomasa seca mediante SSTmg/L cada dos días. Cabe mencionar que todos los parámetros fisicoquímicos realizados se llevaron a cabo por duplicado para cada biorreactor.

Con la finalidad de asegurar la predominancia de las microalgas en estudio (*S. obliquus* y *Desmodesmus* spp.) en los biorreactores, se llevó a cabo la observación al microscopio óptico de cada uno de los cultivos, tanto al inicio como al final de las pruebas. Esta práctica fue de gran utilidad para identificar si se presentaron cambios morfológicos en las células.

## Fase 2: Fase de Limitación de nutrientes

De acuerdo a los resultados obtenidos de los cultivos con lixiviado al 15, 10 y 7%, se seleccionó la condición de 7% de lixiviado, ya que bajo esta condición, se obtuvo mayor concentración de biomasa microalgal, en comparación con 15 y 10%, por lo que resultó ser la mejor condición.

Estos cultivos, con el 7% de lixiviado, fueron sometidos a limitación de nutrientes, la cual consistió inicialmente en concentrar la biomasa de los biorreactores, para ello se dejó sedimentar por 5 días. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se conservó sólo la biomasa dentro los biorreactores. Se adicionó agua residual a los biorreactores como medio de cultivo y para la limitación de nutrientes como se indica a continuación:

Cultivos control: 3 L de agua residual a cada uno.

Cultivos que tenían 7% de lixiviado: 3 L de agua residual diluida con agua destilada (relación 50:50), de tal manera que tuvieran menos nutrientes que los controles.

Se tomaron 200 mL de cada biorreactor, se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, se recuperó la biomasa que fue transferida a cajas Petri y se dejó secar a temperatura ambiente de 3 a 5 días. Transcurrido este tiempo, la biomasa fue recuperada obteniéndose un polvo, que se conservó para su posterior análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Gas Chromatography Mass Espectrometry, por sus siglas en inglés CG/MS) con el fin de identificar el perfil de ácidos grasos inicial en la fase de limitación de nutrientes.

Al igual que en la fase de crecimiento de los cultivos, se realizaron observaciones mediante microscopía óptica, al inicio y al final de la fase de limitación de nutrientes para observar la predominancia de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* así como los posibles cambios en la morfología de las células microalgales.

## Cuantificación de carbohidratos y lípidos

Durante la fase de limitación de nutrientes se llevó a cabo el monitoreo del contenido de carbohidratos y lípidos. Estas biomoléculas se cuantificaron en los cultivos de cada biorreactor por duplicado y dos veces por semana. El monitoreo se hizo con la finalidad de determinar en qué momento del cultivo se presenta un incremento o decremento de las mismas. La cuantificación de los carbohidratos totales se hizo por el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), el cual es uno de los procedimientos más utilizados para la determinación cuantitativa de los carbohidratos ya que detecta todo tipo de estas biomoléculas, además de que es simple, rápido y se obtienen resultados

reproducibles. En este método el  $H_2SO_4$  hidroliza los enlaces glucosídicos y el fenol reacciona con el monosacárido resultante produciendo un compuesto amarillo-marrón, con un pico de absorción a 490 nm.

Para llevar a cabo el procedimiento primero se tomó 1 mL de muestra y se colocó en un tubo de ensayo con rosca, después se le adicionó 1mL de fenol al 5% y finalmente 5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se agitó la muestra y se dejó reposar por 10 min, posteriormente se colocaron los tubos en un baño con agua a 25 °C durante 15 min. Finalmente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro HACH (DR 3900) a una longitud de onda de 490 nm. Se realizó una curva patrón, por triplicado, utilizando glucosa con un rango de concentración de 0-250 mg/L y se muestra en la Figura 5.

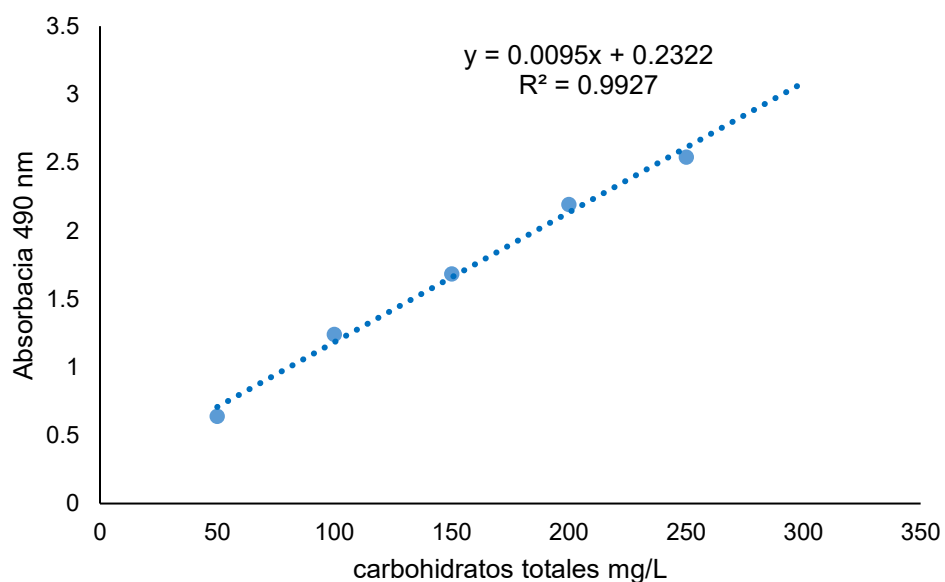


Figura 5. Curva de calibración para carbohidratos totales utilizando glucosa

Los lípidos se cuantificaron por el método colorimétrico de la sulfosfosvainillina (Barnes y Blackstock 1973; Mishra *et al.*, 2014) que, al igual que el de carbohidratos, es rápido y sencillo además se pueden cuantificar los lípidos en medio acuoso por lo que no es necesario secar la biomasa. En este método el ácido sulfúrico, a altas temperaturas, reacciona con los lípidos y forma iones carbonio, estos a su vez reaccionan con el grupo carbonilo de la fosfovainillina formando un compuesto estable de color rosado. Para la determinación de los lípidos se colocó una cantidad de muestra conocida en un tubo de ensayo con rosca, se le agregó 2 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, después las muestras se



calentaron a 100 °C por 15 min, transcurrido el tiempo se pasó la muestra a un baño de hielo, posteriormente se le agregaron 5 mL de sulfofosfovainillina, se mantuvieron a una temperatura de 37 °C por 15 min y finalmente se determinó la absorbancia a 530 nm. Para este método también se realizó una curva patrón, por triplicado, utilizando aceite de canola y se muestra en la Figura 6.

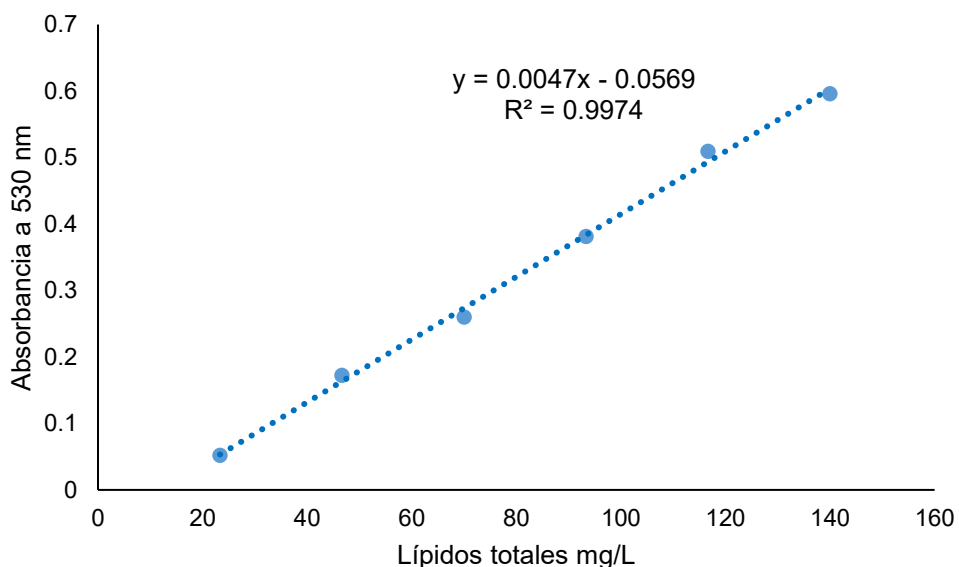


Figura 6. Curva de calibración para lípidos totales utilizando aceite de canola

Al finalizar la fase de limitación de nutrientes se recuperó la biomasa mediante centrifugación a 3000 rpm, se dejó secar en cajas Petri a temperatura ambiente de 3 a 5 días y se recuperó la biomasa con mucha precaución para evitar pérdidas. Finalmente se obtuvo un polvo de biomasa microalgal la cual se conservó para su posterior análisis de perfil de ácidos grasos.

#### Extracción y transesterificación de ácidos grasos

Para la extracción, se utilizó el método gravimétrico reportado por Bligh y Dyer (1959) y modificado por Garces y Mancha (1993) para el cual se colocaron 0.5 gr de biomasa seca en un matraces Erlen Meyer de 50 mL, posteriormente se agregó cloroformo y metanol (2:1, v/v) 10 mL y 5 mL respectivamente. Los matraces fueron sellados con parafilm y colocados en un agitador orbital por 24 h a 140 rpm. Concluido este tiempo, las muestras fueron filtradas para limpiarlas de las partículas sólidas y recuperar los disolventes conteniendo los lípidos. Los disolventes recuperados fueron sometidos a una extracción



líquido-líquido en un embudo de separación, utilizando una solución de cloruro de potasio (KCl) al 0.88% en sustitución de agua para minimizar la pérdida de lípidos, se separó la fase acuosa (superior) y la orgánica (inferior). La fase acuosa se desechó y la fase orgánica recuperada se colocó en un tubo de 20 mL previamente pesado (peso constante). Se dejó evaporar el solvente a presión atmosférica. Posteriormente se pesó el tubo y la cantidad de lípidos extraídos se obtuvo mediante la diferencia de pesos (Ec. 1).

$$\text{Lípidos (g)} = \text{tubo final} - \text{tubo inicial} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

Lípidos (g): lípidos extraídos en gramos

Tubo final: peso del tubo al final de la prueba en gramos

Tubo inicial: peso del tubo al inicio de la prueba en gramos

#### Transesterificación de ácidos grasos

Después de la extracción de lípidos se llevó a cabo la transesterificación para obtener los FAME que fueron identificados por GC/MS. La transesterificación se hizo utilizando metanol y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.04 N como catalizador, las muestras tuvieron un volumen inicial aproximado de 5 mL y se dejaron reaccionar durante 24 h en un agitador orbital a 60 °C (Montes *et al.* 2011; Wahlen *et al.* 2011). Posteriormente las muestras se dejaron evaporar a presión atmosférica hasta obtener un volumen de 2 mL aproximadamente, las muestras se conservaron a 4 °C para su posterior análisis por GC/MS. Para la identificación de los FAME se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6809, acoplado a un espectrofotómetro de masas Agilent Technologies 5973. La detección de los FAME se hizo a través de una columna de separación DB-5ms de sílice fundido con una longitud de 30 metros, un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de película de 0.25 µm. El gas acarreador para el análisis fue helio con 99.9995% de pureza.

Las condiciones de operación fueron las siguientes: la temperatura del inyector fue de 250 °C, con inyección tipo Split, el espectrofotómetro de masas se programó a una temperatura de 280 °C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial 85 °C (5 min) con una rampa de 7 °C/min, hasta llegar a 265 °C (10 min). El espectrofotómetro operó en modo SCAN a 50-550 m/z. Los datos obtenidos se registraron y presentaron en un cromatograma mediante un software especializado (Hewlett Packard Chemstation versión B.02.05). De igual forma el software cuenta con programa de integración, detección

de picos, corrección de líneas base y cálculos finales de abundancia que corresponde al área bajo la curva. Así mismo los FAME de las muestras de microalgas fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar conocido FAME Mix, C8-C24 (Sigma Aldrich, 18918-1AMP, USA). La figura 7 muestra el cromatograma del estándar utilizado.

```
File       :C:\DATA\FAME ANDREA\FAME2 140716.D
Operator   : Andrea
Acquired   : 14 Jul 2016  14:10      using AcqMethod FAME.M
Instrument  : MSD
Sample Name: FAME 2 140716
Misc Info  :
Vial Number: 1
```

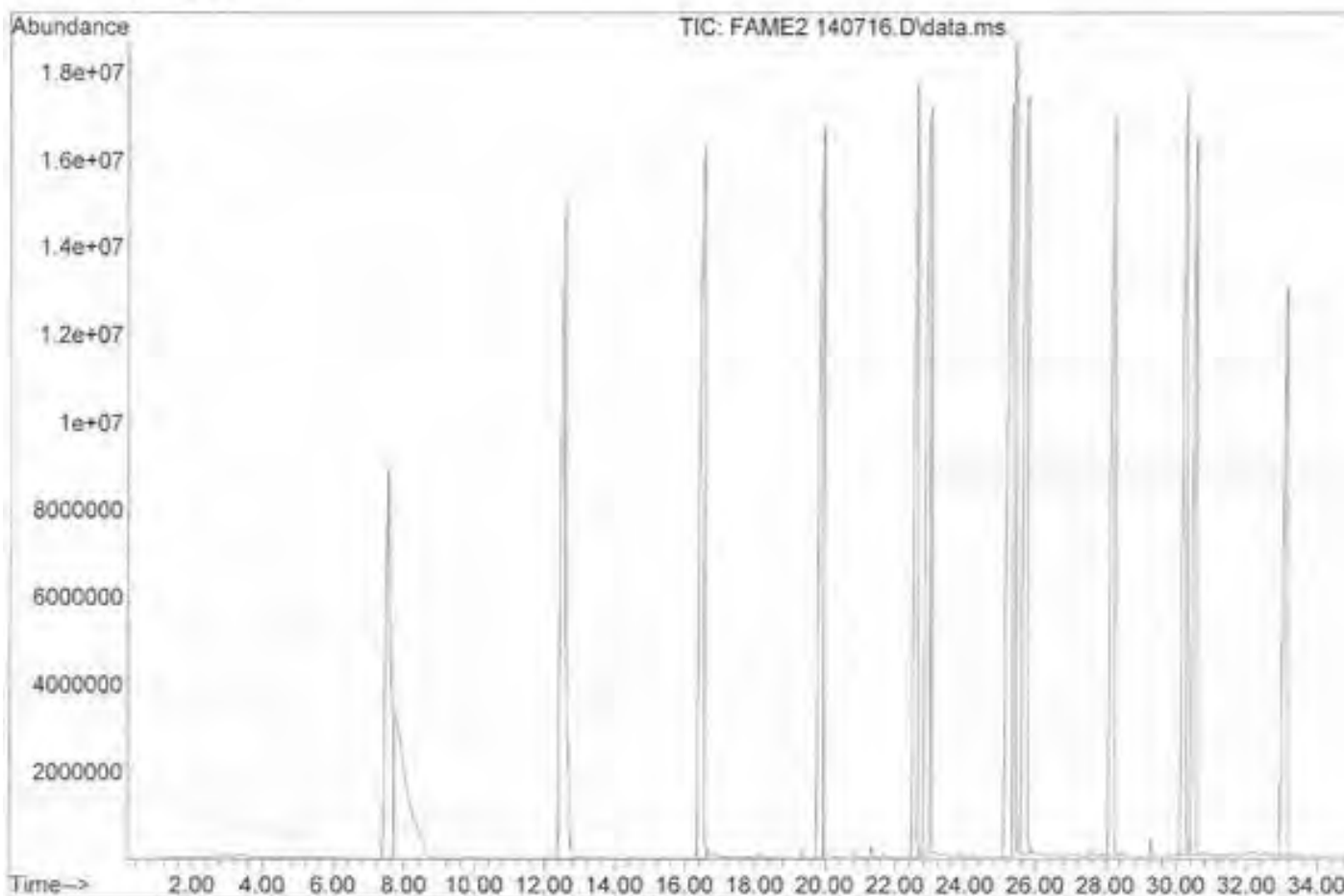


Figura 7. Cromatograma de FAME Mix, C8-C24 (Sigma Aldrich, 18918-1AMP, USA).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Caracterización del agua residual y del lixiviado

En la tabla 4 se presenta un promedio de las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos que se hicieron tanto del agua residual como del lixiviado. Las muestras fueron filtradas, como se mencionó anteriormente en la parte de metodología.

Se puede observar que en ambas muestras el pH es similar, sin embargo, los demás parámetros fisicoquímicos son muy elevados en el lixiviado con respecto al agua residual. Cabe señalar que los valores obtenidos tanto del nitrógeno amoniacal como del nitrógeno total del lixiviado, son casi 14 veces mayores que los obtenidos para el agua residual.

Tabla 4. Características fisicoquímicas promedio del agua residual y el lixiviado.

Parámetro	Agua residual	Lixiviado
pH	8.3 ± 0.5	8.5 ± 0.4
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	70 ± 6.7	290 ± 21.3
Alcalinidad (mg/L)	460 ± 0.5	13,200 ± 23.4
Ortofosfatos (mg/L)	27.98 ± 1.8	53.28 ± 4.5
DQO (mg/L)	457.5 ± 15.2	2,061 ± 22.4
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	102.06 ± 3.2	1,471.4 ± 30.8
Nitrógeno total (mg/L)	112.51 ± 2.4	1,566.8 ± 41.2
Nitratos (mg/L)	12.6 ± 2.5	102.8 ± 5.2

### 7.2 Determinación de especies de *Desmodesmus* spp.

Se determinaron 4 especies y fueron las siguientes: *Desmodesmus intermedius*, *Desmodesmus magnus*, *Desmodesmus communis* y *Desmodesmus opoliensis* (Figura 8) con ayuda de las claves taxonómicas de Hindák (1990) y Hegewald y Silva (1988). La validez taxonómica de las especies determinadas se corroboró en la base de datos de "Algae Base".

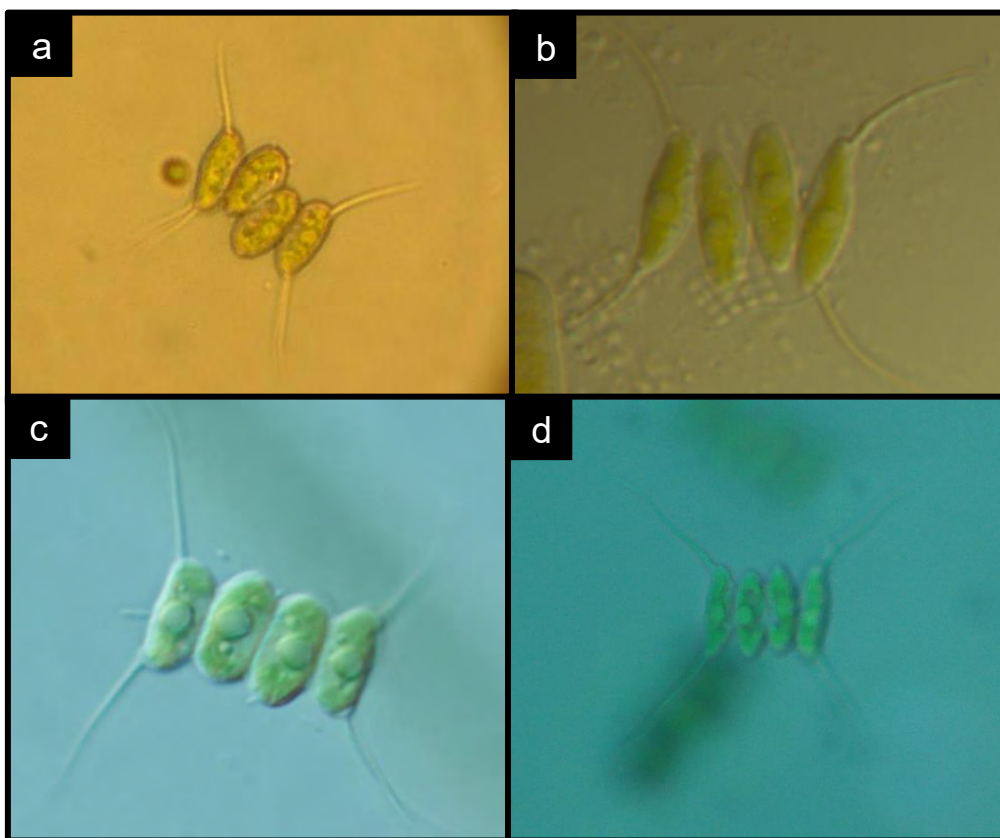


Figura 8. Especies determinadas de *Desmodesmus*. a) *Desmodesmus intermedius*, b) *Desmodesmus opoliensis*, c) *Desmodesmus magnus* y d) *Desmodesmus communis*.

Los cultivos de *S.obliquus*, se obtuvieron a partir de una cepa ya identificada y previamente adaptada al agua residual (Figura 9).



Figura 9. *Scenedesmus obliquus*. a) forma unicelular, b) cenobio de 4 células.

### 7.3 Remoción de nutrientes en agua residual

En los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* se determinaron parámetros fisicoquímicos cada dos días para monitorear los nutrientes y el crecimiento. La curva de crecimiento duró 28 días y los resultados de remoción de nutrientes se presentan en la Tabla 5. Se alcanzó 100% de remoción de nitrógeno amoniacal para ambos géneros, mientras que para ortofosfatos en el cultivo de *S. obliquus* se obtuvo mayor porcentaje de remoción.

Tabla 5. Remoción de nutrientes por las microalgas.

Parámetro	<i>Desmodesmus</i> spp.			<i>S. obliquus</i>		
	inicial	final	remoción (%)	inicial	final	remoción (%)
Ortofosfatos	23.53± 1.2	12± 1	49%	18.36± 1.6	6.32± 1.1	65.57%
N amoniacal	77.47± 1.8	0	100%	73.96± 2	0	100%
N Total	77.84± 1.5	39.25± 1.1	49.57%	75.92± 1.3	7.45± 1.4	90.18%

Se obtuvieron gráficas de SSTmg/L comparando ambos géneros y se observó que su crecimiento es similar, *Desmodesmus* spp. alcanzó 430 mg/L de biomasa y *S. obliquus* alcanzó 452.5 mg/L de biomasa (Figura 10). Así mismo se obtuvieron productividades de 0.019 g/L.d para *Desmodesmus* spp. y de 0.023 g/L.d para *S. obliquus* respectivamente.

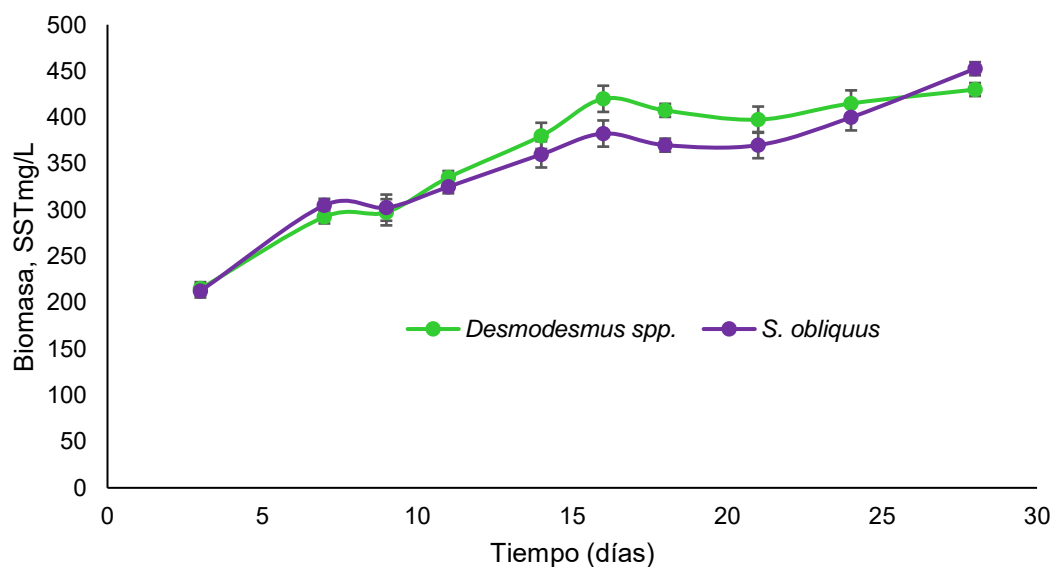


Figura 10. Curvas de crecimiento medida como SSTmg/L de los dos géneros de microalgas.

La remoción de nutrientes, de los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus*, a lo largo de la curva de crecimiento se muestra representado en las Figuras 11 y 12 respectivamente. Se puede observar que conforme hay un incremento en la biomasa, tienden a disminuir los nutrientes, principalmente el nitrógeno amoniacal, ya que es la principal fuente de N de las microalgas, debido a que estos microorganismos lo asimilan más fácilmente. La remoción de nitrógeno amoniacal en el presente trabajo fue del 100% para ambas microalgas y con respecto a los ortofosfatos, el cultivo de *Desmodesmus* spp. removi6 alrededor del 50%, mientras que el de *S. obliquus* alcanz6 65%. Estos resultados comparados con los reportados por Samori *et al.* (2013), son similares en cuanto a la remoci6n de nitr6geno amoniacal, ya que tambi6n obtuvieron 100% de remoci6n. Para el caso de los ortofosfatos ellos obtuvieron tambi6n el 100% de remoci6n, mientras que en la presente tesis los porcentajes fueron menores. Cabe mencionar que ellos trabajaron con un cultivo de *Desmodesmus communis* y un consorcio de microalgas en el que predominaban especies del g6nero de *Scenedesmus* y *Desmodesmus*. De igual forma Zahng *et al.* (2014) investigaron la remoci6n del N y P a partir de agua residual dom6stica utilizando *S. obliquus* y obtuvieron 100% de remoci6n tanto para nitr6geno como para f6sforo. Ji *et al.* (2014) utilizaron *Desmodesmus* sp. y reportaron remociones del 88 y 85% de N y P, respectivamente a partir de un efluente secundario. De acuerdo a la literatura y a los resultados obtenidos, las microalgas pertenecientes a los g6neros de *Desmodesmus* y *Scenedesmus* resultan ser eficientes para la remoci6n de nutrientes como el N y el P, ayudando a mejorar la calidad del agua residual por lo que resultan una buena opci6n como tratamiento de dichos residuos.

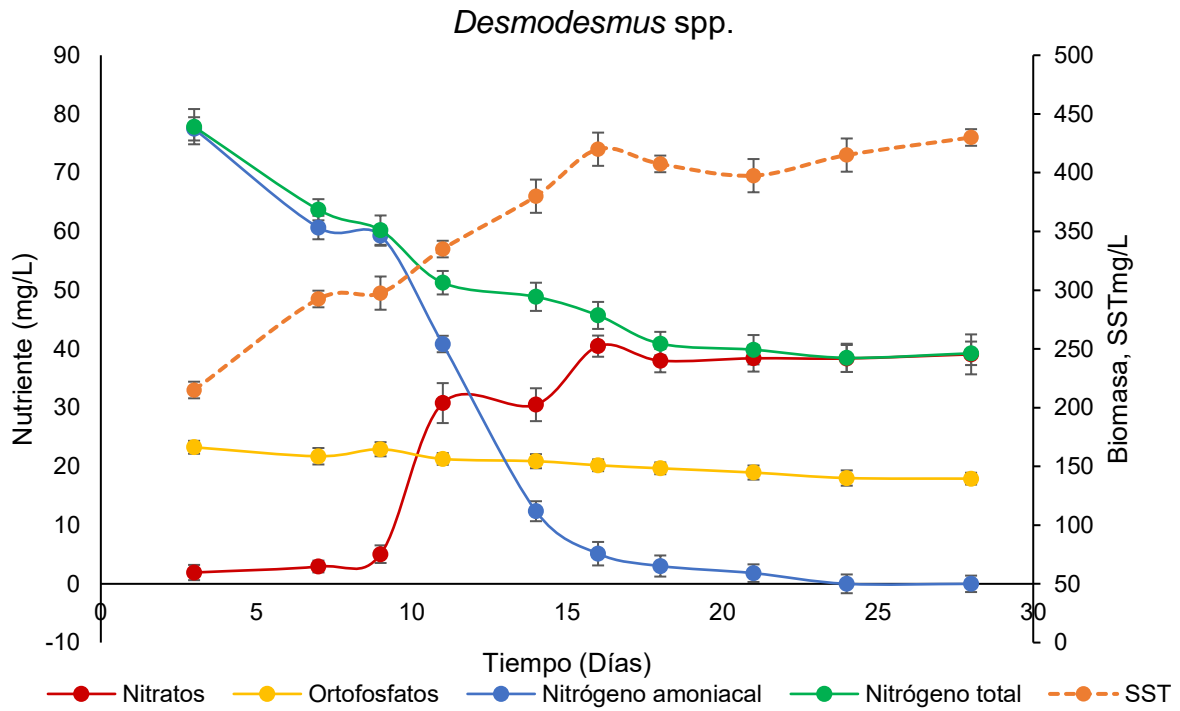


Figura 11. Monitoreo durante 28 días de los parámetros fisicoquímicos en el cultivo de *Desmodemus spp.*

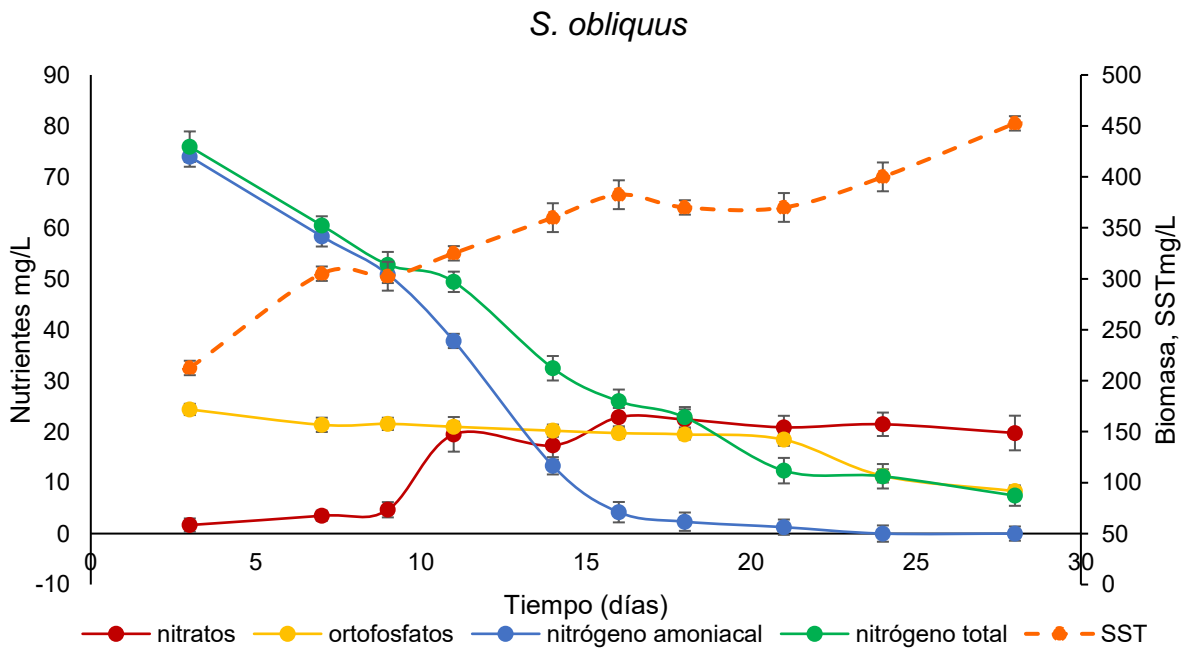


Figura 12. Monitoreo durante 28 días, de los parámetros fisicoquímicos en el cultivo de *S. obliquus*.

### Cuantificación de lípidos y carbohidratos

A partir de la biomasa obtenida de los cultivos en agua residual, se cuantificaron los lípidos y carbohidratos durante la curva de crecimiento y los resultados se presentan en la figura 13. De acuerdo a Garofalo (2009) y Pan *et al.* (2011) el contenido lipídico de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus*, durante la fase de crecimiento, es menor al 15%, dichos resultados coinciden con lo obtenido en la presente tesis ya que el porcentaje de lípidos siempre se mantiene entre 10 y 11%. Por otro lado se observó que los carbohidratos al final de la fase de crecimiento aumentan obteniendo un 15%.

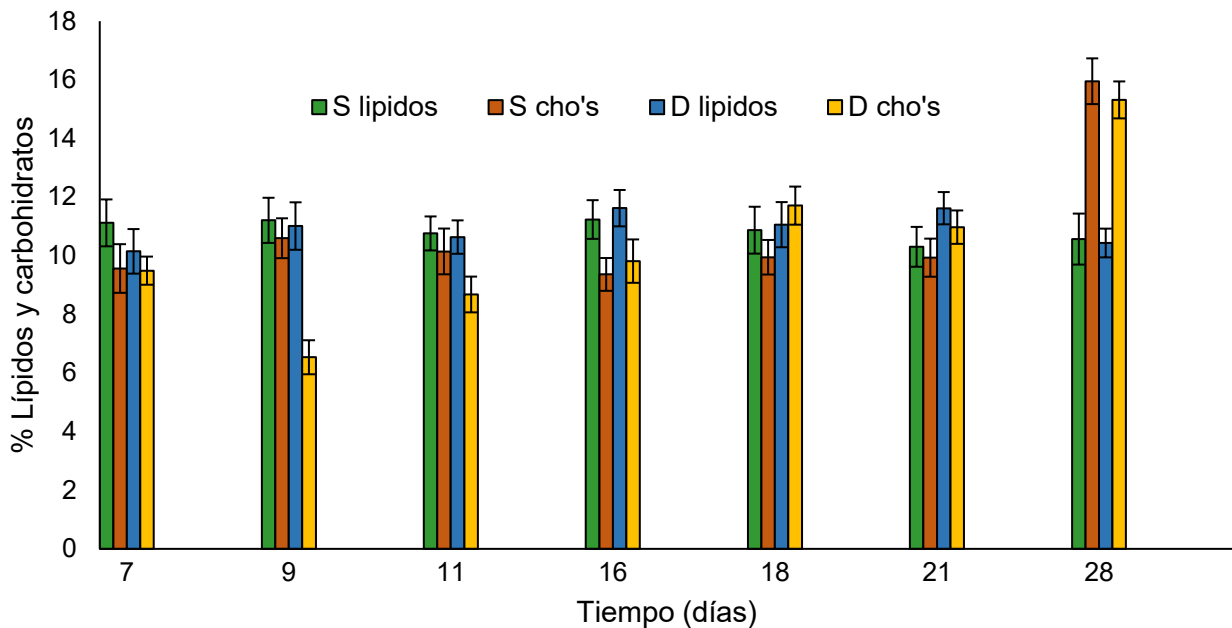


Figura 13. Porcentaje de lípidos y carbohidratos de *S. obliquus* y de *Desmodesmus* spp. en agua residual S lípidos= % de lípidos en *S. obliquus*, S cho's= % de carbohidratos en *S. obliquus*, D lípidos= % de lípidos de *Desmodesmus* spp., D cho's= % de carbohidratos de *Desmodesmus* spp.

Estos resultados obtenidos utilizando solo agua residual como medio de cultivo para *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus*, permitieron saber cómo se comportan estas especies de microalgas en el agua residual con respecto a los nutrientes. Lo que sirvió de base para determinar la cantidad de inóculo que debe utilizarse para llevar a cabo los experimentos utilizando las mezclas de agua residual más lixiviado, así como el tiempo aproximado que durarán las curvas de crecimiento de los cultivos, además determinar cada cuando es



necesario hacer las mediciones analíticas correspondientes como los nutrientes y la concentración de biomasa.

#### 7.4 Cultivo de *Desmodemus* spp. y *S. obliquus* en una mezcla de agua residual y lixiviado

##### Fase de crecimiento

Se evaluó tanto el crecimiento, como la remoción de nutrientes de *Desmodemus* spp. y *S. obliquus* en una mezcla de agua residual y lixiviado al 15, 10 y 7%. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos antes mencionados por duplicado de cada biorreactor al inicio y al final de cada curva de crecimiento y los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características fisicoquímicas promedio de los cultivos de *Desmodemus* spp. y *S. obliquus* al inicio de la curva de crecimiento.

INICIAL								
%	Cultivo	Ortofosfatos	DQO	N Amoniacal	Alcalinidad	N total	Nitratos	pH
15	SC	14.14 ± 0.90	541.17 ± 14.0	55.77 ± 0.4	285 ± 5.3	62.47 ± 0.6	6.1 ± 1.12	8.31 ± 0.14
	SL	19.75 ± 0.79	853.83 ± 65.6	279.92 ± 1.5	2037.5 ± 22.5	294.22 ± 1.5	15.2 ± 0.92	8.43 ± 0.41
	DC	12.97 ± 0.69	569.33 ± 52.9	55.07 ± 1.1	285 ± 5.2	59.43 ± 1.0	5.9 ± 1.3	8.24 ± 0.24
	DL	18.98 ± 0.75	831.00 ± 45.5	274.56 ± 3.5	2037.5 ± 20.1	284.95 ± 2.8	14.1 ± 2.5	8.57 ± 0.44
10	SC	21.41 ± 0.10	430.12 ± 12.8	68.4 ± 0.53	305 ± 8.3	74.47 ± 0.6	4.7 ± 1.1	8.26 ± 0.15
	SL	23.83 ± 0.39	540.83 ± 25.6	225.03 ± 1.6	1600.3 ± 12.8	237.22 ± 1.1	10.2 ± 1.03	8.35 ± 0.33
	DC	19.97 ± 0.19	400.5 ± 17.2	63.4 ± 1.65	297 ± 7.5	69.43 ± 1.2	4.9 ± 0.8	8.22 ± 0.13
	DL	22.98 ± 0.64	513.33 ± 28.3	217.2 ± 2.8	1600 ± 12.5	231.95 ± 1.8	10.1 ± 1.2	8.41 ± 0.40
7	SC	16.13 ± 0.04	380 ± 14.5	44.3 ± 2.64	340 ± 14.3	50.2 ± 2.5	3.8 ± 0.18	8.51 ± 0.21
	SL	20.10 ± 0.21	460.83 ± 25.2	145.2 ± 1.9	695 ± 7.07	158.85 ± 2.3	8.4 ± 0.25	8.74 ± 0.15
	DC	16.23 ± 0.05	371.5 ± 18.1	47.6 ± 1.9	380 ± 14.5	65.7 ± 1.7	4.4 ± 0.6	8.52 ± 0.24
	DL	21.28 ± 0.11	468.33 ± 23.8	167.5 ± 0.6	715 ± 17.5	179.1 ± 2.4	10 ± 0.35	8.69 ± 0.17

SC= *S. obliquus* control; DC= *Desmodemus* spp. control  
 SL= *S. obliquus* lixiviado; DL= *Desmodemus* spp. lixiviado

Tabla 7. Características fisicoquímicas promedio de los cultivos de *Desmodemus* spp. y *S. obliquus* al final de la curva de crecimiento.

FINAL								
%	Cultivo	Ortofosfatos	DQO	N Amoniacal	Alcalinidad	N total	Nitratos	pH
15	SC	6.08 ± 0.2	72.83 ± 2.0	8.07 ± 2.9	106.6 ± 11.5	6.22 ± 2.38	3.4 ± 1.2	10.07 ± 0.25
	SL	18.82 ± 0.1	630.33 ± 1.6	217.3 ± 4.6	1950 ± 22.5	220.15 ± 4.3	12.2 ± 0.2	9.36 ± 0.21
	DC	5.32 ± 0.1	90 ± 6.6	7.6 ± 0.8	116.6 ± 15.3	7.41 ± 1.0	3.12 ± 1.3	10.02 ± 0.15
	DL	17.79 ± 0.1	630.5 ± 2.2	220.1 ± 2.3	1896 ± 21.5	228.5 ± 1.4	10.7 ± 1.5	9.42 ± 0.11
10	SC	8.8 ± 0.16	64.2 ± 3.0	7.2 ± 0.27	130.7 ± 16.4	6.3 ± 0.18	2.3 ± 0.1	10.21 ± 0.05
	SL	19.1 ± 0.53	332.5 ± 5.6	133.1 ± 1.5	1282.3 ± 13.1	130.5 ± 2.5	7.4 ± 0.2	9.87 ± 0.16
	DC	8.1 ± 0.24	55.7 ± 2.06	6.1 ± 0.13	119.4 ± 15.2	5.1 ± 0.3	2.5 ± 0.1	10.25 ± 0.15
	DL	18.3 ± 0.41	320.4 ± 2.7	130.6 ± 1.63	1289.1 ± 16.1	134.2 ± 3.26	7.4 ± 0.2	9.95 ± 0.11
7	SC	6.4 ± 0.06	57.83 ± 2.0	2.0 ± 0.07	136.6 ± 18.5	4.3 ± 0.08	2.1 ± 0.1	10.3 ± 0.5
	SL	11.9 ± 0.05	166.25 ± 1.6	30.8 ± 0.2	395.4 ± 15.1	40.6 ± 1.5	5.7 ± 0.3	10.6 ± 0.17
	DC	6.9 ± 0.04	43.25 ± 1.06	2.03 ± 0.1	149.3 ± 11.4	6.1 ± 0.6	2.1 ± 0.3	10.2 ± 0.25
	DL	12.2 ± 0.04	153.2 ± 2.2	30.4 ± 0.13	399.6 ± 18.4	40.9 ± 1.26	6.9 ± 0.2	10.4 ± 0.31

SC= *S. obliquus* control; DC= *Desmodemus* spp. control  
 SL= *S. obliquus* lixiviado; DL= *Desmodemus* spp. lixiviado

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de remoción en los cultivos de microalgas con las tres diferentes concentraciones de lixiviado con agua residual, se puede apreciar una mayor remoción de nutrientes y por lo tanto una mejoría en la calidad del agua al utilizar una mezcla de agua residual con 7% de lixiviado en comparación con los cultivos en los que se utilizó mayor porcentaje de lixiviado: 15% y 10%.

Tabla 8. Porcentaje de remoción de los cultivos de *Desmodemus* spp y *S. obliquus*.

PORCENTAJE DE REMOCIÓN							
%	Cultivo	Ortofosfatos	DQO	N Amoniacal	Alcalinidad	N total	Nitratos
15	SC	57.0	86.5	85.5	62.6	90.0	44.3
	SL	4.7	26.2	22.4	4.3	25.2	15.1
	DC	59.0	84.2	86.2	59.1	87.5	47.1
	DL	6.3	24.1	19.8	6.9	19.8	14.9
10	SC	58.9	85.1	89.5	57.1	91.5	51.1
	SL	19.8	38.5	40.9	19.9	45.0	27.5
	DC	59.4	86.1	90.4	59.8	92.7	49.0
	DL	20.4	37.6	39.9	19.4	42.1	26.7
7	SC	60.3	84.8	95.5	59.8	91.4	44.7
	SL	40.8	63.9	78.8	43.1	74.4	32.1
	DC	57.4	88.4	95.7	60.7	90.7	52.3
	DL	42.7	67.3	81.9	44.1	77.2	31.0

SC= *S. obliquus* control; DC= *Desmodemus* spp. control  
 SL= *S. obliquus* lixiviado; DL= *Desmodemus* spp. lixiviado

Por otro lado, al comparar la remoción obtenida entre *Desmodemus* spp. con respecto a *S. obliquus* de los cultivos con el 7% de lixiviado, se puede observar que presentan porcentajes de remoción muy similares de ortofosfatos, DQO, N amoniacal, alcalinidad, N total y nitratos (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de remoción de los cultivos de *Desmodemus* spp. y *S. obliquus* con lixiviado al 7%.

PORCENTAJE DE REMOCIÓN EN CULTIVOS AL 7% DE LIXIVIADO						
Cultivo	Ortofosfatos	DQO	N Amoniacal	Alcalinidad	N total	Nitratos
<b>SL</b>	40.8	63.9	78.8	43.1	74.4	32.1
<b>DL</b>	42.7	67.3	81.9	44.1	77.2	31.0

SL= *S. obliquus* lixiviado; DL= *Desmodemus* spp. lixiviado

Los resultados obtenidos respecto al crecimiento de los cultivos utilizando agua residual mezclada con los tres porcentajes de lixiviado (15, 10 y 7%), se muestran en la Figura 14.

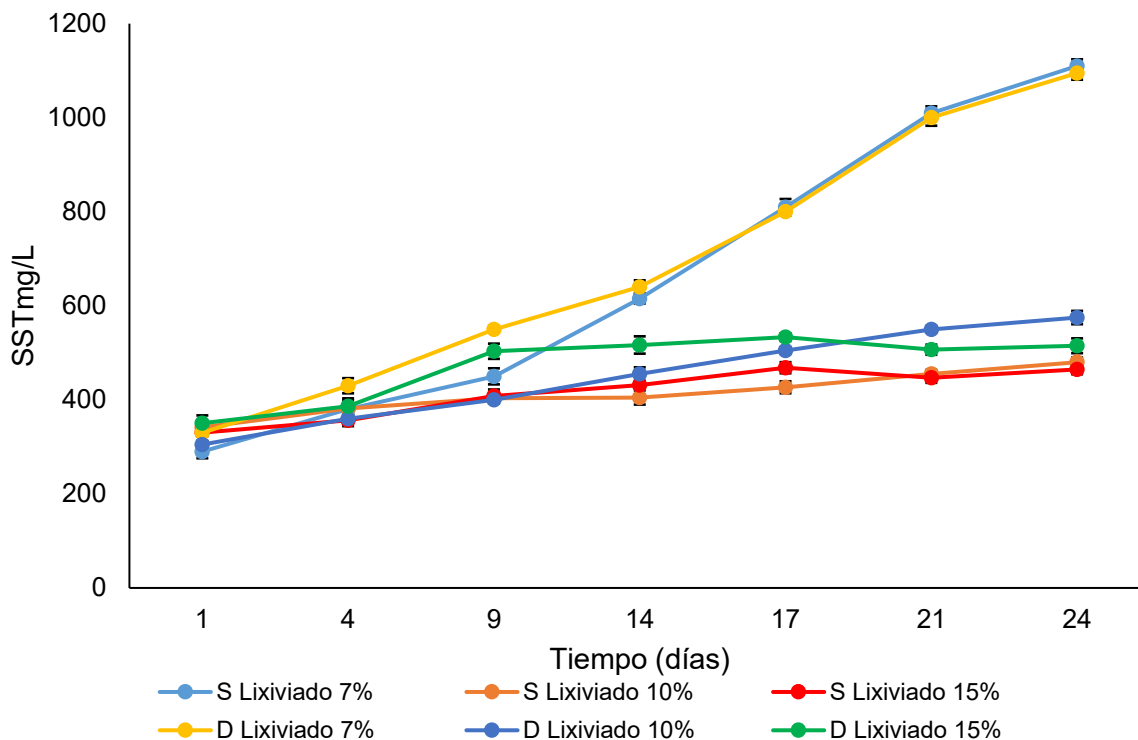


Figura 14. Crecimiento de los cultivos de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp. en agua residual y lixiviado al 15, 10 y 7%. S= *S. obliquus*, D= *Desmodesmus* spp.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observaron tanto efectos negativos como positivos del lixiviado sobre el crecimiento microalgal. En general el 7% de lixiviado (167 mg/L en *Desmodesmus* spp. y 145 mg/L de nitrógeno amoniacal en *S. obliquus*) favoreció el crecimiento de las microalgas, ya que se obtuvo más del doble de biomasa comparado con los demás tratamientos. Además también se obtuvieron mayores productividades (Tabla 9). Los otros porcentajes de lixiviado, limitaron el crecimiento, debido a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal (279 mg/L - 217 mg/L).

Tabla 9. Biomasa y productividades de los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* con los tres diferentes porcentajes de lixiviado.

Cultivo	% de lixiviado	Biomasa g/L	Productividad g/L.d
SL	15	0.465	0.013
	10	0.480	0.020
	7	1.185	0.036
DL	15	0.515	0.018
	10	0.575	0.024
	7	1.260	0.039

SL= *S. obliquus* lixiviado; DL= *Desmodesmus* spp. lixiviado

Para confirmar estadísticamente lo anterior, se hizo un análisis de varianza con nivel de significancia del 5% por separado para *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus*. Se encontraron diferencias significativas y por lo tanto se hicieron dos pruebas de Tukey a las medias de los tratamientos, una para *Desmodesmus* spp. y otra para *S. obliquus*. Se encontró que los cultivos al 7% fueron significativamente diferentes, corroborándose que este tratamiento generó mayor cantidad de biomasa que los otros porcentajes de lixiviado, obteniendo para *Desmodesmus* spp. 1.260 g/L y para *S. obliquus* 1.185 g/L a los 28 días de cultivo.

Estos efectos tanto estimulatorios como inhibitorios del crecimiento en dichos microorganismos han sido reportados por otros autores. Cheung *et al.* (1992) trabajaron con *Scenedesmus* y reportan que a partir de concentraciones de 143 mg/L de nitrógeno amoniacal, se inhibe el crecimiento. Así mismo Lin *et al.* (2007) reportaron que a una concentración de 135 mg/L de nitrógeno amoniacal se estimula el crecimiento, mientras que, a concentraciones más altas a este valor, se inhibe. Por otro lado, Zaho *et al.* (2014) obtuvieron mayor crecimiento con 183 mg/L de nitrógeno amoniacal y a mayores concentraciones observaron de igual manera un efecto inhibitorio. Estas concentraciones reportadas se encuentran cercanas a las utilizadas en este trabajo con el 7% de lixiviado. Con respecto al 15 y 10% de lixiviado, al tener concentraciones más elevadas de nitrógeno amoniacal, provocó un efecto inhibitorio, lo cual es similar a lo reportado por los autores antes mencionados. Tal efecto es debido a que el nitrógeno amoniacal puede inhibir la actividad fotosintética. Otros factores que pudieron causar toxicidad del lixiviado son la salinidad y el color debido a que presenta una coloración café oscuro muy intensa y por lo tanto pudo haber reducido la incidencia de luz en el cultivo (Cheung *et al.* 1992; Zaho *et al.* 2014).

Cabe mencionar que este efecto inhibitorio del crecimiento está relacionado con la baja remoción de nutrientes que se obtuvo con esos cultivos (15 y 10%) como se menciona anteriormente ya que al no crecer las microalgas, no hubo remoción de nutrientes debido a que éstas son las que asimilan el nitrógeno y fósforo.

Con respecto a los cambios morfológicos, se observó que al inicio de los cultivos, en agua residual, predominó la forma unicelular en *S. obliquus*. En *Desmodesmus* spp. predominó la forma unicelular y los cenobios de dos células, además las células presentaron espinas. Al final de la curva de crecimiento, se observaron cenobios de 4 y 8 células en *S. obliquus*. En los cultivos de *Desmodesmus* spp. predominaron cenobios de 4 y 2 células con espinas. Con respecto a los cultivos con los tres porcentajes de lixiviado, al inicio de las curvas, se observó de igual manera que predominaron las formas unicelulares en ambos géneros y de cenobios de dos células en *Desmodesmus* spp. En este último cultivo, se observó la pérdida de espinas. Esta tendencia de desintegración del cenobio en células solitarias son cambios morfológicos que presentan dichas especies (Cheung *et al.* 1992), a esto se le conoce como plasticidad fenotípica y estos cambios ocurren en respuesta a las condiciones ambientales (Lürling, 2003). Por ejemplo, el exceso de N provocó que predominaran las formas unicelulares y la pérdida de espinas. Por el contrario, debido a la limitación de este elemento, predominó la forma cenobial de 2 a 8 células en *S. obliquus*, y de 2 a 4 células en *Desmodesmus* spp. Estos cambios morfológicos en respuesta a las condiciones ambientales también ha sido reportado por Pancha *et al.* (2014).

#### Fase de limitación de nutrientes

Como la mezcla de agua residual y lixiviado al 7% fue en la que mayor cantidad de biomasa se obtuvo, estos cultivos se dejaron sedimentar por 5 días. Posteriormente se le retiró a cada biorreactor 3 litros del sobrenadante. Se les agregaron 3 litros de agua residual a los controles y a los cultivos que tenían el lixiviado se les agregó la misma cantidad de volumen pero de agua residual diluida con agua destilada (relación 50:50). Se cuantificaron lípidos y carbohidratos a cada biorreactor dos veces por semana. Se puede observar en la Figura 15 que la concentración de biomasa se incrementó tanto en los controles como en los cultivos que se encontraban en limitación de nutrientes. Se obtuvo una máxima concentración de 1.950 g/L en el cultivo de *Desmodesmus* spp. con una productividad de 0.013 g/L.d y de 1.750 g/L en el cultivo de *S. obliquus* con una productividad de 0.013 g/L.d, ambas provenientes del cultivo con lixiviado. Este incremento de la biomasa durante la limitación de nutrientes también ha sido reportado por Breuer *et al.* (2012). Con respecto a

*S. obliquus* se observa un incremento al final de la curva, esto es debido a la presencia de otra microalga y se explica más adelante.

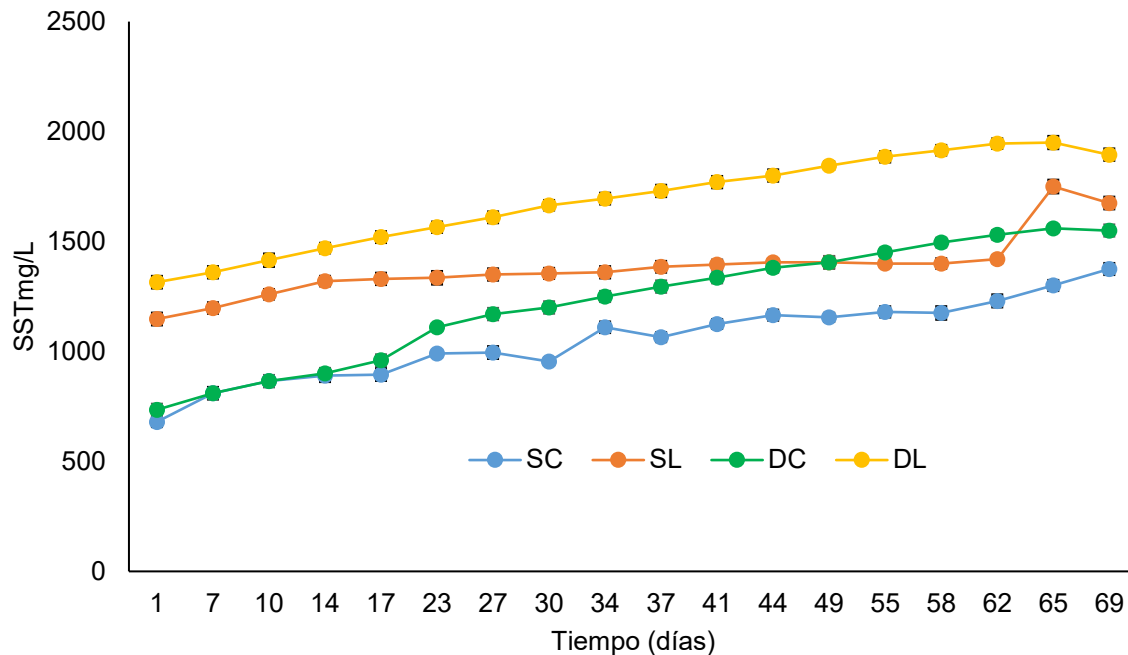


Figura 15. Crecimiento de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp. durante la fase de limitación de nutrientes. S= *S. obliquus*, D= *Desmodesmus* spp., C= control, L= limitación de nutrientes.

El porcentaje de lípidos y carbohidratos se muestran en las Figuras 16 y 17. Se puede observar que el cultivo de *Desmodesmus* spp., en condiciones de limitación de nutrientes, obtuvo mayor cantidad de carbohidratos alcanzando 41% mientras que de lípidos 20%. En los cultivos control de *Desmodesmus* spp. se obtuvo 25% de carbohidratos y 15% de lípidos, por lo tanto se puede observar que hubo un incremento del 16% de carbohidratos en condiciones de limitación de nutrientes y del 5% de lípidos respectivamente.

Con respecto a *S. obliquus*, se alcanzó 30% de carbohidratos y 16% de lípidos en condiciones de limitación de nutrientes. En los cultivos control se obtuvo 30% de carbohidratos y 12% de lípidos, observándose que la cantidad de carbohidratos fue la misma y de lípidos solo e incrementó 4%.

La mayor cantidad de carbohidratos se alcanzó primero que la de lípidos, para ambas microalgas, como era de esperarse ya que las microalgas al estar en condiciones de estrés (en este caso en limitación de nutrientes) empiezan a almacenar compuestos de reserva. Primero sintetizan carbohidratos y después de un tiempo prolongado de estrés, llevan a

cabo la síntesis de lípidos, esto con el fin de sobrevivir a las condiciones adversas ya que mediante estos compuestos de reserva, altamente energéticos, la célula puede obtener la energía necesaria para llevar a cabo sus procesos metabólicos y ajustar su crecimiento a las condiciones ambientales en las que se encuentren (Geider y La Roche, 2002; Markou *et al.* 2012). Resulta interesante observar que cuando empiezan a decaer los carbohidratos, a partir del día 58, es cuando empiezan a aumentar los lípidos. Esto es debido a que los productos resultantes del catabolismo de los carbohidratos, son precursores de la síntesis de lípidos. Esta relación entre ambas biomoléculas también ha sido reportada por Breuer *et al.* (2012), Ho *et al.* (2012); Chen *et al.* (2013). Estos resultados nos sugieren que el tiempo que dure la limitación de nutrientes es fundamental, ya que de esta manera es posible manipular la acumulación de biomoléculas con alto valor energético como lo son los lípidos y los carbohidratos y posteriormente transformarlos para la obtención de biodiesel y bioetanol.

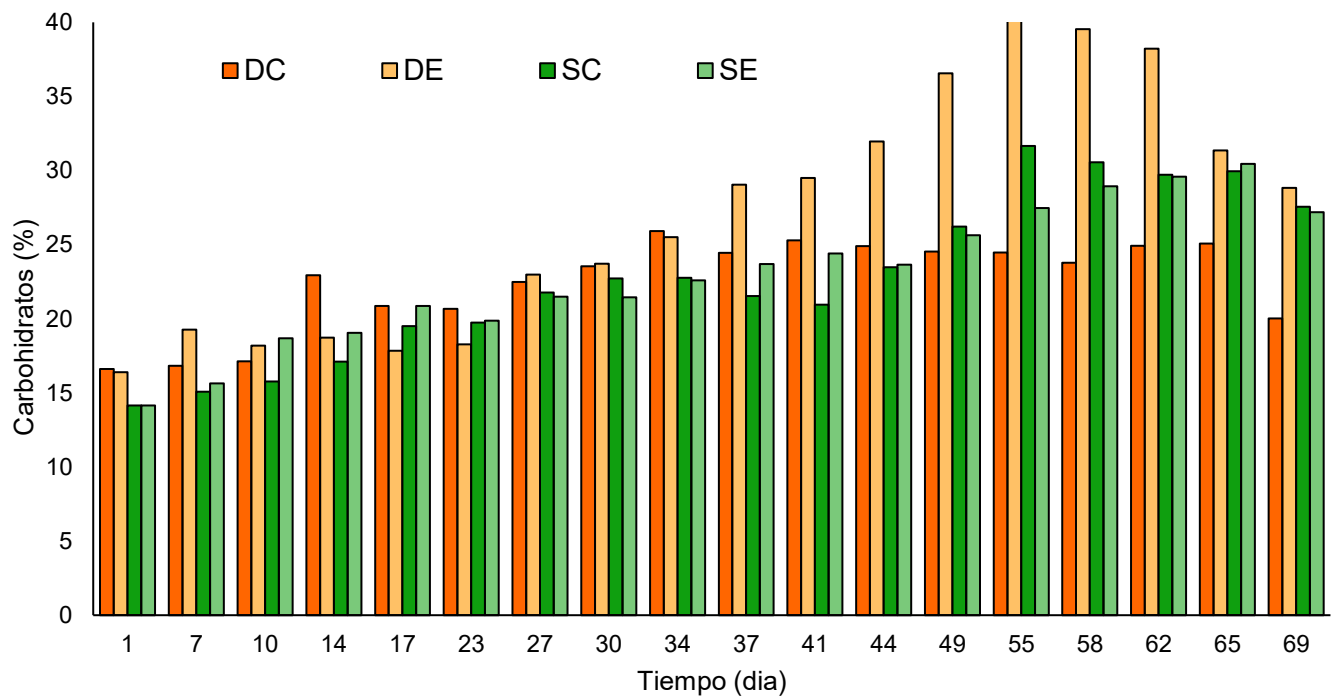


Figura 16. Porcentaje de carbohidratos totales de los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* durante la fase de estrés. S= *S. obliquus*, D= *Desmodesmus* spp., C= control, E= estrés.



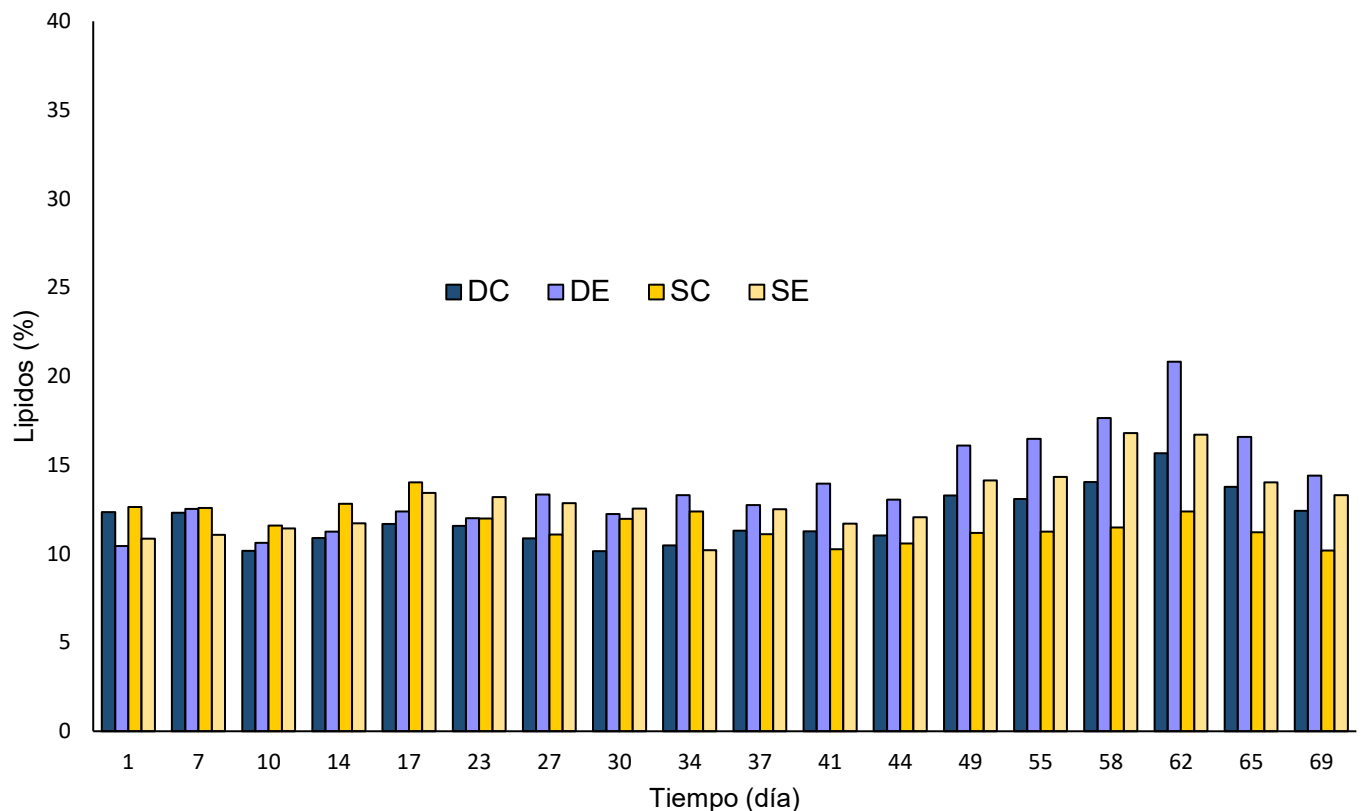


Figura 17. Porcentaje de lípidos totales de los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* durante la fase de estrés. S= *S. obliquus*, D= *Desmodesmus* spp., C= control, E= estrés.

En esta fase de limitación, también se hicieron observaciones al microscopio al inicio y al final. Se observó al inicio la presencia de formas unicelulares y de cenobios de 4 células en los cultivos de *S. obliquus*. En *Desmodesmus* spp. se observaron cenobios de 2 y 4 células, con y sin espinas. Al final de la fase de limitación, se observó predominancia de cenobios de 4 células en *Desmodesmus* spp. En *S. obliquus* se observaron cenobios de 4 células. Es importante mencionar que en estos últimos cultivos, se observó otra microalga presente la cual se identificó como *Nannochloropsis* sp. Se hizo un conteo para saber la proporción en la que se encontraban ambas microalgas y se obtuvo 80% de *Nannochloropsis* sp. y 20% de *S. obliquus*. Debido a esto es que en la Figura 16 se observa un incremento de la biomasa al final de las curvas de *S. obliquus* ya que al parecer empezaba la fase de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. En los cultivos de *Desmodesmus* spp. también se observó la presencia de *Nannochloropsis* sp. pero en menor proporción. De igual manera se hizo un conteo y se obtuvo 90% de *Desmodesmus* spp. y 10% de *Nannochloropsis* sp. (Figura 18). Probablemente por esto es que se obtuvo mayor cantidad de lípidos y

carbohidratos en *Desmodesmus* spp. que en *S. obliquus* a pesar de que se reportan mayores cantidades de estas biomoléculas para esta última microalga.

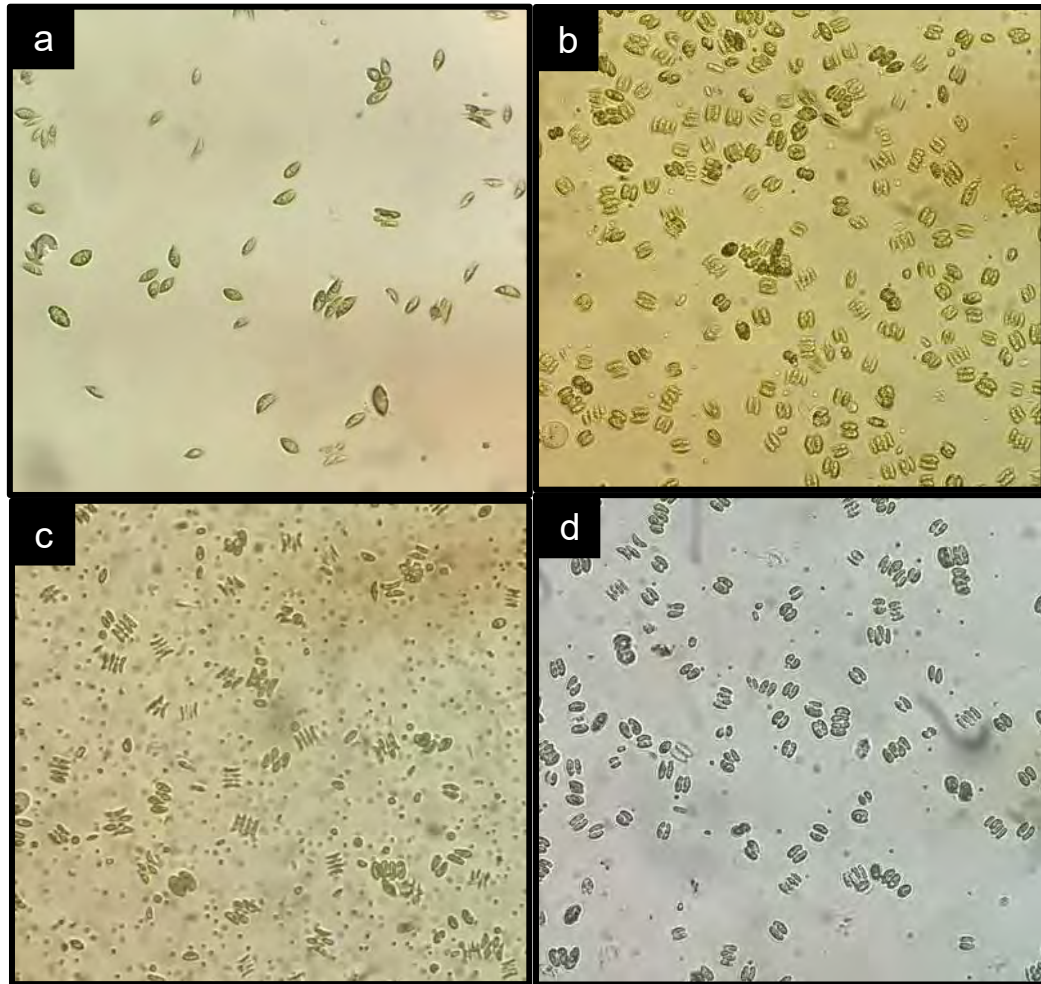


Figura 18. A) *S. obliquus* al inicio de la limitación de nutrientes. B) *Desmodesmus* spp. al inicio de la limitación de nutrientes. C) *S. obliquus* al final de la fase con *Nannochloropsis*. D) *Desmodesmus* spp. al final de la fase con *Nannochloropsis*.

Finalmente se obtuvo el perfil de ácidos grasos mediante GC/MS, para este análisis se utilizó biomasa que se guardó al inicio y al final de la fase de estrés con el fin de comparar si existen diferencias iniciales y finales durante la fase de limitación de nutrientes (Tabla 11).

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos y abundancia relativa de *S. obliquus* y *Desmodesmus* spp. al inicio y al final de la fase de limitación de nutrientes.

Ácido graso	Abundancia relativa %							
	<i>S. obliquus</i>				<i>Desmodesmus</i> spp.			
	Inicial		Final		Inicial		Final	
	C	E	C	E	C	E	C	E
Ácido dodecanoico C12:0	3.73	—	—	—	—	—	—	—
Ácido tetradecanoico C14:0	2.52	1.98	1.07	1.59	1.47	1.2	—	—
Ácido pentadecanoico C15:0	1.36	—	1.29	1.42	—	—	—	—
Acido palmítico C16:0	22.75	19.23	15.93	17.02	15.77	15.66	12.93	16.06
Ácido palmitoleico C16:1	4.15	6.36	6.6	6.12	6.86	6.36	4.18	5.10
Ácido heptadecanoico C17:0	—	—	0.65	0.73	—	—	—	—
Acido esteárico C18:0	7.01	4.14	1.87	1.21	4.58	2.67	1.74	2.09
Ácido oléico C18:1	—	—	—	3.62	—	—	—	—
Ácido linoleico C18:2	5.43	6	7.83	7.85	7.95	9.91	10.22	9.44
Ácido linolénico C18:3	17.68	17.66	11.79	12.24	21.06	22.1	20.25	30.53
Acido gamma linolénico C18:3	—	—	1.89	2.54	—	—	0.92	0.79
Acido araquidónico C20:4	—	—	1.42	2.87	—	—	1.1	1.48
Ácido docosanoico C22:0	—	0.85	0.77	—	0.84	1.05	—	—
Ácido hexacosanoico C26:0	—	—	—	—	1.22	1.3	1.91	2.24
<b>Saturados</b>	57.82%	46.6%	42.22%	38.40%	36.52%	32.41%	27.55%	26.8%
<b>Monoinsaturados</b>	6.42%	11.31%	12.91%	17.02%	13.52%	12.71%	11.44%	10.84%
<b>Poliinsaturados</b>	35.75%	42.08%	44.86%	44.57%	48.55%	53.13%	61.01%	62.37%
<b>C16-C18</b>	88.22%	94.96%	89.83%	88.45%	94.09%	94.1%	94.34%	94.5%

C = Control; E = Estrés

En las figuras 19 y 20 se puede observar en general que los ácidos grasos de mayor abundancia relativa tanto en *Desmodesmus* spp. como en *S. obliquus* fueron el C16 y C18 ya que son los que más comúnmente se sintetizan en las algas verdes (Hu *et al.* 2008; Garofalo, 2009). De estos ácidos, los que tuvieron mayor abundancia relativa fueron el ácido palmítico (C16:0) y el linolénico (C18:3), esto es similar a lo reportado por Pakawadee *et al.* 2012; Samori *et al.* 2013; Valeriano, 2013; Komolafe *et al.* 2014; Xia *et al.* 2014. Los ácidos grasos que le siguen a estos con respecto a la abundancia relativa son el ácido palmitoléico (C16:1), el esteárico (C18:0) y el linoleico (C18:2).

### *S. obliquus*

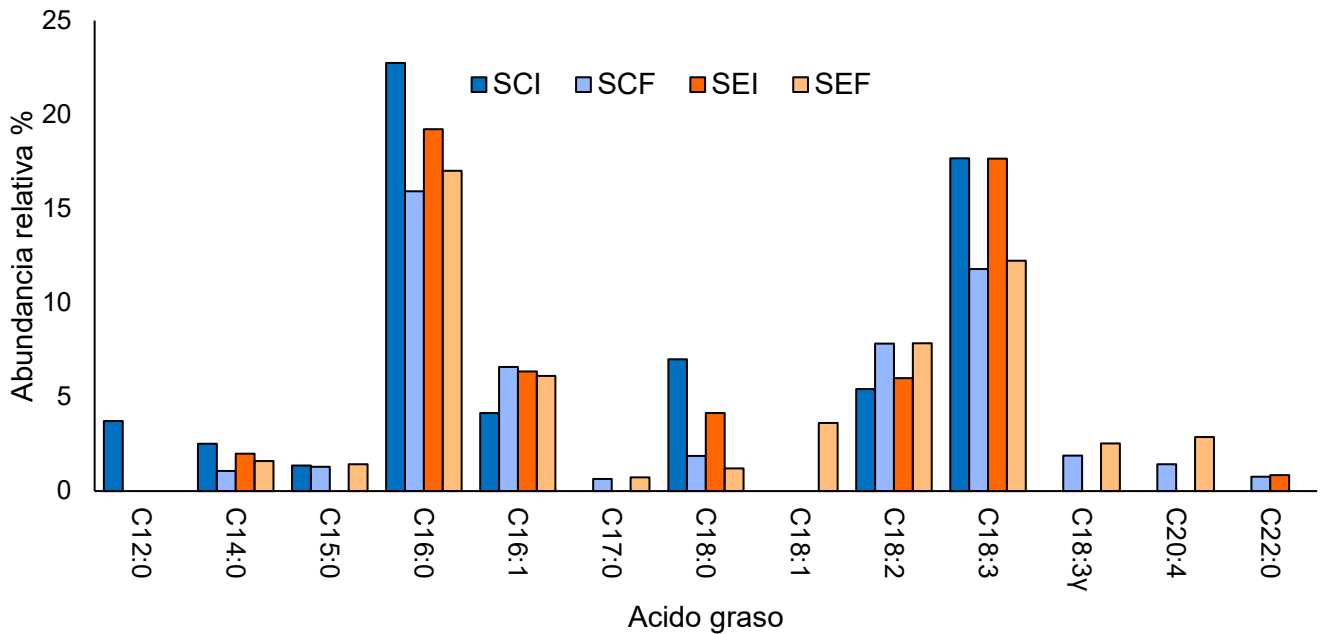


Figura 19. Abundancia relativa de los ácidos grasos presentes en los cultivos de *S. obliquus* al inicio y al final de la fase de estrés. S= *S. obliquus*, C= control, E= estrés, I= inicial, F= final.

### *Desmodemus spp.*

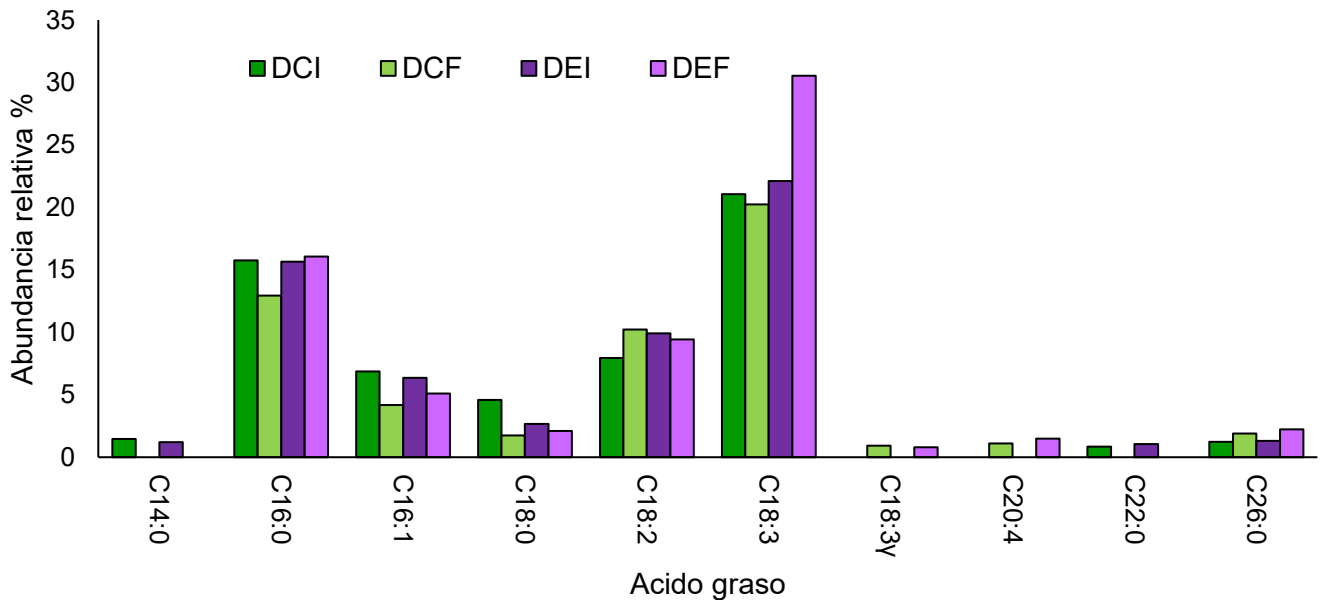


Figura 20. Abundancia relativa de los ácidos grasos presentes en los cultivos de *Desmodemus spp.* al inicio y al final de la fase de estrés. D= *Desmodemus spp.*, C= control, E= estrés, I= inicial, F= final.

También se puede observar que el ácido linolénico (C18:3) fue de mayor abundancia en *Desmodesmus* spp. al final de la fase de estrés de los cultivos que durante la etapa de crecimiento estuvieron en lixiviado. Con respecto a *S. obliquus* se obtuvieron más ácidos grasos al final de la fase de estrés, observándose que aparecen varios ácidos grasos insaturados pertenecientes a los ácidos esenciales de la serie omega 6 como el linoléico (C18:2), gamma linolénico (C18:3) y araquidónico (C20:4); y de la serie omega 3 como el linolénico (C18:3), sin embargo, cabe mencionar que en este cultivo al final predominó la microalga *Nannochloropsis* sp. por lo que el perfil final es de una mezcla de ambas microalgas.

En la figura 21 se puede observar que en *Desmodesmus* spp. los ácidos grasos poliinsaturados incrementan al final de la fase de estrés con respecto al inicio de dicha fase ya que se obtuvieron más del 60% de abundancia relativa de dichos ácidos (Ji *et al.* 2015). A pesar de que en los cultivos de *S. obliquus* con *Nannochloropsis* sp., también incrementaron los ácidos poliinsaturados al final de la fase de estrés, se obtuvo mayor cantidad de ácidos grasos saturados en estos cultivos con respecto a *Desmodesmus* spp. (Figura 21). Esto es similar con los trabajos de Bertoldi *et al.* (2006) y Pan *et al.* (2011) ya que ellos obtuvieron mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en limitación de nutrientes.

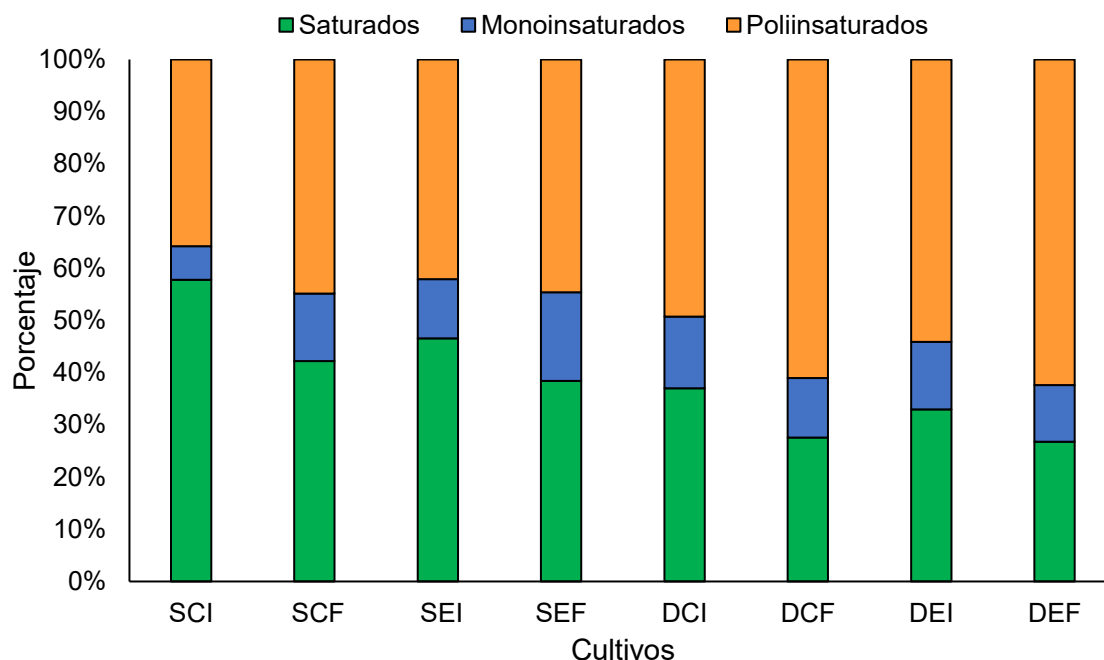


Figura 21. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en los cultivos de *Desmodesmus* spp. y *S. obliquus* al inicio y al final de la fase de estrés. S= *S. obliquus*, D= *Desmodesmus* spp., C= control, E= estrés, I= inicial, F=final.

De acuerdo a Hoekman *et al.* (2012) se ha determinado de que una composición óptima de ácidos grasos para el biodiesel son bajos niveles de ácidos saturados y poliinsaturados y altos niveles de ácidos monoinsaturados. Dado que el grado de insaturación en los ácidos grasos obtenidos en este trabajo aumenta en condiciones de limitación de nutrientes, no resulta favorable para la producción de biodiesel ya que esto afectaría la estabilidad oxidativa del mismo. Esto se refiere, a la capacidad del biodiesel a resistir cambios físicos y químicos ocasionados por la interacción con el ambiente como la luz y la temperatura. La interacción de los ácidos grasos, presentes en el biodiesel, con el oxígeno lo hacen inestable, es decir susceptible a la oxidación (Saluja *et al.* 2016). Dos de los factores que promueven tal oxidación es la poliinsaturación de los ácidos grasos y la posición de los dobles enlaces. En el caso del ácido linolénico, dichos factores hacen que su estructura resulte ser muy inestable. Sin embargo se ha reportado y sugerido que para mejorar la estabilidad del biodiesel se puede llevar cabo una mezcla de aceites (Álvarez *et al.* 2015), por ejemplo se ha reportado la mezcla del aceite de palma, en el que predominan ácidos grasos monoinsaturados, con el aceite de jatropha y soya, en los que predominan los ácidos grasos poliinsaturados. Otra opción es que se pueden combinar ciertos parámetros fisicoquímicos para modificar el perfil de ácidos grasos por ejemplo combinar la limitación de nutrientes con la salinidad, la iluminación o aireación con CO<sub>2</sub> ya que se ha reportado que la combinación de dichos parámetros puede ayudar a incrementar los ácidos grasos monoinsaturados (Ho *et al.* 2012; Xia *et al.* 2014; Álvarez *et al.* 2015).

Por otro lado, como se obtuvieron ácidos grasos esenciales omega 3 y 6, la biomasa de las microalgas utilizadas en este trabajo, podría ser utilizada para complementar la nutrición de animales, sin embargo, un aspecto importante a considerar antes de recomendarla para tal uso, es determinar su contenido de metales pesados debido a que el lixiviado cuenta con la presencia de estos componentes.

## 8. CONCLUSIONES

La estrategia en dos fases, primero la fase de crecimiento con lixiviado y después la fase de limitación de nutrientes, permitió obtener mayor cantidad de lípidos y carbohidratos, así como de biomasa.

Las especies determinadas utilizadas en este trabajo fueron *Desmodesmus intermedius*, *Desmodesmus magnus*, *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus opoliensis*, y *Scenedesmus obliquus*.

El porcentaje de lixiviado óptimo para el crecimiento de las microalgas fue de 7% que corresponde a una concentración de nitrógeno amoniacal de 145 a 167 mg/L.

Tanto *Desmodesmus* spp. como *S. obliquus* son una opción como tratamiento biológico de agua residual junto con lixiviados ya que toleran altas concentraciones de nitrógeno, obteniéndose una remoción de 80% de nitrógeno amoniacal y 40% de ortofosfatos.

La limitación de nutrientes provocó el incremento de lípidos y carbohidratos, resultando mejor *Desmodesmus* spp. ya que se obtuvo casi 2 g/L de biomasa, 20% de lípidos y 41% de carbohidratos. Dado que se obtuvieron más carbohidratos que lípidos, la biomasa microalgal obtenida resulta ser más viable para la producción potencial de bioetanol.

El perfil de ácidos grasos se ve modificado por el estrés fisiológico que se provocó en las microalgas, provocando el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados, dentro de los cuales se encontraron omega 3 y 6.

Cabe mencionar que la morfología de ambas especies se vio afectada por la cantidad de N presente en el medio.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Alvarado Granados A. R. (2012). Experiencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en el Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. 230 pp.
2. Ana-Maria S. y Maria G. (2010). Municipal solid waste landfilling and treatment of resulting liquid effluents. *Environmental Engineering and Management Journal*. 9: 993–1019.
3. APHA-AWWA-WPCF (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17ª ed. Ed. Díaz Santos. España.
4. Aslan S. y Kapdan I. K. (2006). Batch kinetics and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. 28 (1): 64-70.
5. Bertoldi F. C., Sant'Anna E., Villela C. B. M. y Barceros O. J. L. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y aceites*. 57 (2): 270-274.
6. Breuer G., Lamers P. P., Martens D. E., Draaisma R. B. y Wijffels R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*. 124: 217–226.
7. Brown M. R., Jeffrey S.W. y Garland C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: A literature review, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories (CSIRO), Report. 205, 44 pp.
8. Cai T., Park S. Y. y Li Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 19: 360-369.
9. Caldwell D.H. (1946). Sewage oxidation ponds- performance operation and design. *Sewage Works J*. 18: 453-458.
10. Chandra R., Rohit M. V., Swamy Y.V. y Venkata Mohan S. (2014). Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*. 1-9.
11. Charity E. Andrade R., Alexandra L. Vera B., Carmen H. Cárdenas L. y Ever D. Morales A. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 32 (2): 126 – 134.



12. Cheung K.C., Chu L.M. y Wong M.H. (1992). Toxic effect of landfill leachate on microalgae. *Water, Air & Soil Pollution*. 69 (3–4): 337–349.
13. Chen C. Y., Zhao X. Q., Yen H. W., Ho S. H., Cheng C. L., Lee D. J., Bai F. W. y Chang J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*. 78: 1– 10.
14. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25. p 294–306.
15. CONAGUA (2014). Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. Comisión Nacional del Agua, México.
16. Contreras E. F. (1994). Manual de técnicas hidrobiológicas. Ed. Trillas. México. 141 pp.
17. Colomer M. F. J. y Gallardo I. A. (2007). Tratamiento y gestión de residuos sólidos Limusa. UPV. México. D.F.
18. De-Bashan L.E., Moreno M., Hernandez J.P. y Bashan Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36: 2941–2948.
19. De la Noüe J., Laliberte G. y Prouls D. (1992). Algae and wastewater. *Journal of Applied Phycology*. 4: 247-254.
20. Domozych D.S., Ciancia M., Fangel J.U., Mikkelsen M.D., Ulvskov P. y Willats W.G.T. (2012). The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science*. 3: 82.
21. Fukami K., Nishijima T. y Ishida Y. (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*. 358: 185–191.
22. Garibay H. A., Vázquez D. R., Sánchez S. M. P., Serrano C. L. y Martínez J. A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 13: 3. p. 38-61.
23. Garofalo R. (2009). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2<sup>nd</sup> generation biofuels. *AquaFUELS. Taxonomy, Biology and Biotechnology*. 1–258.
24. Geider R. J. y La Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*. 37:1-17.
25. Gerardo M. L., Oatley-Radcliffe D. L. y Lovitt R. B. (2014). Integration of membrane technology in microalgae biorefineries. *Journal of Membrane Science*. 464: 86–99.

26. Granum E., Kirkvold S. y Myklestad S. M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and aminoacids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology and Progress Series*. 242: 83-94.
27. Gómez L. L. M. (2007). Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista cubana de Química*. 19 (2): 3-20.
28. Gonzalez L.E. y Bashan Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when co-immobilized and co-cultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1527–1531.
29. Ho S.H., Chen C.Y. y Chang J.S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*. 244–252.
30. Ji F., Liu Y., Hao R., Li G., Zhou Y. y Dong R. (2014). Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*. 161: 200–207.
31. Ji F., Zhou Y., Pang A., Ning L., Rodgers K., Liu Y. y Dong R. (2015). Fed-batch cultivation of *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 184: 116-122.
32. Johansen Melanie N. (2012). *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. Nova Science Publishers. 475 p.
33. Kojima H. y Lee Y. K. (2001). *Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology*. Springer-Verlag. Hong-Kong. 310 pp.
34. Komolafe O., Velasquez O. S. B., Monje R. I., Yáñez N. I., Harvey A. P. y Orta L. M. T. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*. 154: 297–304.
35. Kurniawan T.A., Lo W., Chan C. y Sillanpää M.E.T. (2010). Biological processes for treatment of landfill leachate. *Journal of Environmental Monitoring*. 12: 2032–2047.
36. Larsdotter K. 2006. *Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a nordic climate*. A doctoral thesis from the School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. pp. 44.
37. Laurens L. M. L., Van Wycken S., McAllister J. P., Arrowsmith S., Dempster T. A., McGowen J. y Pienkos P. T. (2014). Strain, biochemistry, and cultivation-dependent

- measurement variability of algal biomass composition. *Analytical Biochemistry*. 452: 86–95.
38. Lee S. H., Ahn C. Y., Jo B. H., Lee S. A., Park J. Y., An K. G. y Oh H. M. (2013). Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N:P ratio in wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23 (1): 92-98.
  39. Lee R. E. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press. Fourth Edition. New York. 547 p.
  40. Lin L., Chan G.Y.S., Jiang B.L. y Lan C.Y. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste Management*. 27:1376–1382.
  41. Loera Q. M. M. y Olguin E. J. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología ambiental y algal*. 1 (1): 91-116.
  42. Markou G. y Georgakakis D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agroindustrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*. 3389-3401.
  43. Mata T., Martins A. A. y Caetano N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14 (1): 217-232.
  44. Mata T. M., Melo A. C., Simões M. y Caetano N. S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 107: 151–158.
  45. Mouget J.L., Dakhama A., Lavoie M.C. y De la Noue J. (1995). Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?. *FEMS Microbiology Ecology*. 18: 35–43.
  46. Muñoz R. y Guieysse B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*. 40: 2799 – 2815.
  47. Mustafa E. M., Phang S. M. y Chu W. L. (2012). Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of Applied Phycology*. 24:953–963.
  48. Nie X., Fan C., Wang Z., Su T., Liu X. y An T. (2015). Toxic assessment of the leachates of paddy soils and river sediments from e-waste dismantling sites to microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 111: 168–176.

49. NOM-83-SEMARNAT. (s.f.). Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y manejo especial. Diario oficial de la federación.
50. Olguin E. J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal process. *Biotechnology Advances*. 22: 81-91.
51. Ördög V., Stirk W.A., Bálint P., van Staden J. y Lovász C. (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*. 24: 907–914.
52. Orta de Velásquez M. T., González M. S., Monje R. I. y Valdivia S. C. A. (1999). Estudio de tratabilidad de lixiviados en la planta de tratamiento de aguas residuales municipales Santa Fe. Realizado para la Dirección General de Servicios Urbanos del D.F.
53. Orta de Velásquez M.T., Valencia R., Yañez I., Monje I. y Londoño W. de J. (2006). Alternativa de tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios en plantas de aguas residuales urbanas. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales*. 1: 1.
54. Oswald W.J. y Gotaas H.B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *American Society of Civil Engineers*. 122: 73-105.
55. Oswald W.J. (2003). My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology*. 15: 99–106.
56. Pan Y. Y., Wang S.T., Chuang L.T., Chang Y. W. y Chen C. N. N. (2011). Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology*. 102:10510–10517.
57. Pancha I., Chokshi K., George B., Ghosh T., Paliwal C., Maurya R y Mishra S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *Bioresource Technology*. 156: 146–154.
58. Pittman J. K., Dean A. P. y Osundeko O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 102 (1): 17-25.
59. Prathima D. M., Venkata S. G. y Venkata M. S. (2011). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*. 1-8.

60. Raouf-Abdel N., Al-Homaidan A. A. y Ibraheem I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 257-275.
61. Razzak S. A., Hossain M. M., Lucky R. A., Bassi A. S. y Lasa H. (2013). Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27:622–653.
62. Rodolfi L., Zitelli G.C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G. y Tredici M.R. (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.
63. Salazar G. M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*. 59: 64-70 p.
64. Saluja R. K., Kumar V. y Sham R. (2016). Stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 62: 866–881.
65. Samori G., Samori C., Guerrini F. y Pistocchi R. (2013). 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. *Water Research*. 47: 791-801.
66. Schumacher G., Blume T. y Sekoulov I. (2003). Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm. *Water Science and Technology*. 47:195–202.
67. Sheehan J., Dunahay T., Benemann J. y Roessler P. (1998). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.
68. Sforza E., Emara M. H. K. A., Sharif A., y Bertucco A. (2015). Exploitation of Urban Landfill Leachate as Nutrient Source for Microalgal Biomass Production. *Chemical Engineering Transactions*. 43.
69. Sunil K., Chart C. y Ackmez M. (2011). Bioreactor landfill technology in municipal solid waste treatment: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 31: 77–97.
70. Tian-Yuan Z., Yin-Hu W., Shu-feng Z., Feng-Min L. y Hong-Ying H. (2013). Isolation and heterotrophic cultivation of mixotrophic microalgae strains for domestic wastewater treatment and lipid production under dark condition. *Bioresource Technology*. 149: 586–589.

71. Val H. S., Sturm B. S. M., de Noyelles F. J. y Billings S. A. (2009). The Ecology of algal biodiesel production. *Cell press Trends in Ecology and Evolution*. 25: 301-309.
72. Valeriano G. M. T. 2013. Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en ácidos grasos precursores de biodiesel durante la separación de microalgas mediante ozoflotación. Tesis de maestría. UNAM. México, DF.
73. Vera T. P. (2011). Estudios ambientales y riesgos naturales. Aportaciones del sureste de México III, Colección Jaguar, UNICACH, 1a edición. Chiapas, México.
74. Watanabe T., Kitajima C. y Fujita S. (1983). Nutritional values of live organism used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*.34:115-143.
75. Williams P. J. le B., y Laurens L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. *Energy and Environmental Science*. 3: 554–590.
76. Wolfaardt G.M., Lawrence J.R., Robarts R.D. y Caldwell D.E. (1994). The role of interactions, sessile growth, and nutrient amendments on the degradative efficiency of amicrobial consortium. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 331–340.
77. Wu L. F, Chen P. F., Huang A. P. y Lee C. M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*. 113: 14–18.
78. Xia L., Rong J., Yang H., He Q., Zhang D. y Hu C. (2014). NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. *Bioresource Technology*. 161: 402–409.
79. Xin L., Hong-ying H., Ke G. y Ying-xue S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101: 5494–5500.
80. Zhang C., Zhang Y., Zhuang B. y Zhou X. (2014). Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 171:71–79.
81. Zhao X., Zhou Y., Huang S., Qiu D., Schideman L., Chai X. y Zhao Y. (2014). Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource Technology*. 156: 322–328.