



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos.

Tesis que presenta

IE. Harbey Eliud Nanduca Nolasco

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Julio, 2015

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

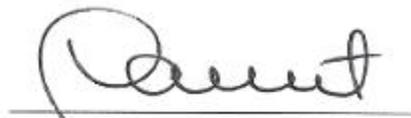
Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusiones de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en la Unidad de Energía Renovable y en el Laboratorio USF15 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o de desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

22 de junio de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Harbey Eliud Nanduca Nolasco', written over a horizontal line.

Harbey Eliud Nanduca Nolasco

El trabajo de tesis con el título “Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos” fue desarrollado por entero en el laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por el alumno Harbey Eliud Nanduca Nolasco bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este mismo Centro.



Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia  
Centro de Investigación Científica de Yucatán AC

## Agradecimientos

A mi asesor Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por brindarme su confianza y darme todo el apoyo y ayuda desde el principio y hasta la conclusión de este trabajo, ya que gracias a su experiencia y conocimiento fomentó en mí lo necesario en todo momento. De todo corazón muchas gracias por creer en mí.

Al comité tutorial: Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Julio César Sacramento, así como a los revisores Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por sus invaluable comentarios, su atención, tiempo y disposición brindada.

A la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda por su invaluable apoyo intelectual y moral otorgado hacia mi persona, y convertirse en parte fundamental en la realización de este trabajo.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por donar la melaza utilizada en este estudio y por contribuir con sus consejos y facilitar el equipo para realizar este trabajo.

A la Sra. Hortencia Marina Ruiz por donar el aguamiel de café utilizado en este trabajo.

A la QFB Silvia López Adrián, por la donación de la microalga *Scenedesmus* sp.

A los técnicos QI Tanit Toledano Thompson y M en C Jorge Domínguez Maldonado por su apoyo y conocimiento brindado en el manejo y utilización de los equipos. Gracias por su amabilidad, disponibilidad y tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (Nº de apoyo: 341129) para realizar los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán AC (CICY) por permitir la realización de este trabajo.

A la Unidad de Energía Renovable (UR) por el apoyo y facilitar las instalaciones para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos Elda May, Isaura España, Katia Ancona, Arely Briceño, Muriel González, Karyl Guzmán, Francisco del Rio y Romeo Iván Moreno, por brindarme sus apoyos, darme críticas que enriquecieron el trabajo, por servir como soporte moral y colaborar con su confianza. Por ser verdaderos amigos en cada momento de angustias y alegrías, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencias en Energía Renovable, por estar presente con críticas constructivas y siempre estar dispuestos a ofrecer sus apoyo y ayuda, muchas gracias.

## Dedicatoria

*Esta tesis se la dedico con mucho amor y cariño a mi familia, en especial a mis padres, Eliud Nanduca Saldaña y María Antonia Nolasco Marina, así como a mis hermanos Greis Marieli, Frederic y Edwin Nanduca Nolasco, que a través de su apoyo, confianza, amor y ejemplo me han incentivado a superar cada reto de mi vida ....*

## ÍNDICE

Índice de Tablas .....	i
Índice de Figuras .....	ii
Resumen .....	iv
Abstract .....	v
Introducción .....	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES .....	3
1.1. Las microalgas.....	3
1.2. Características generales del género <i>Scenedesmus</i> .....	4
1.3. Producción de lípidos para biocombustibles .....	5
1.4. Limitación de nitrógeno .....	7
1.5. Medios de cultivo .....	8
1.6. Agua residual .....	8
1.7. Residuos agroindustriales para el enriquecimiento del medio de cultivo .....	10
1.7.1. Residuos de la industria del café .....	11
1.7.2. Características de la melaza .....	13
Justificación.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivo General .....	16
Objetivos particulares.....	16
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1. Estrategia experimental .....	17
2.2. Material biológico .....	18
2.3. Medios de cultivo .....	18
2.4. Cultivo de las microalgas .....	18
2.5. Determinación del tipo de agua residual sintética.....	19
2.6. Aguamiel de café en agua residual sintética .....	20
2.7. Melaza en agua residual sintética.....	20
2.8. Determinación del volumen de inóculo.....	20
2.9. Conteo celular .....	21
2.10. Recolección y productividad de biomasa.....	21
2.11. Experimentos de producción de lípidos. ....	22

2.12. Extracción de lípidos .....	22
2.13. Transesterificación .....	22
2.14. Cromatografía de gases .....	23
2.15. Determinación de nitrógeno total.....	23
2.16. Determinación de fosfatos.....	24
2.17. Determinación de sulfatos.....	24
2.18 Determinación de azúcares reductores .....	24
2.19. Análisis Estadístico .....	24
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSION .....	25
3.1. Curva de crecimiento en medio TAP1 .....	25
3.2. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos.....	26
3.2.1. Concentración celular.....	26
3.2.2. Producción de biomasa.....	27
3.2.3. Producción de lípidos .....	28
3.2.4. Contenido de lípidos.....	29
3.3. Curvas de crecimiento en agua residual sintética.....	30
3.4. Caracterización del aguamiel de café.....	31
3.5. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando AMC.....	32
3.5.1. Determinación de la concentración de agua miel de café en agua residual sintética. ...	32
3.5.2. Determinación del volumen de inóculo.....	34
3.5.3. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en aguamiel de café.....	35
3.5.4. Consumo de nitrógeno de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en aguamiel de café.....	36
3.5.5. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en aguamiel de café para la producción de lípidos.....	37
3.5.5.1. Concentración celular.....	37
3.5.5.2. Producción de biomasa seca.....	38
3.5.5.3. Producción de lípidos .....	39
3.5.5.4 Efecto de la fase de producción de lípidos en la productividad de biomasa y lípidos de <i>Scenedesmus</i> sp. en AMC .....	41
3.6. Caracterización de la melaza.....	43
3.7. Cultivo en Melaza .....	43

3.7.1.	Determinación de la concentración de melaza en agua residual sintética.....	43
3.7.2.	Determinación del volumen de inóculo.....	44
3.7.3.	Curvas de crecimiento con melaza.....	46
3.7.4.	Consumo de nitrógeno de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en melaza.....	46
3.7.5.	Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en melaza para la producción de lípidos (Fase PL).....	47
3.7.5.1.	Concentración celular.....	48
3.7.5.2.	Producción de biomasa.....	48
3.7.5.3	Producción de lípidos.....	49
3.7.5.4	Efecto de la Fase de producción de lípidos en la productividad de biomasa y lípidos de <i>Scenedesmus</i> sp. en melaza.....	51
3.8.	Perfil de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).....	52
	CONCLUSIONES.....	55
	PERSPECTIVAS.....	56
	BIBLIOGRAFÍA.....	57
	Anexo A.....	64

## Índice de Tablas

Tabla 1. 1. . Agua residual en México [44].	9
Tabla 1. 2. Tratamiento de aguas residuales en lagunas de alta tasa de oxidación [39].	10
Tabla 1. 3. Sustancias contenidas en la pulpa del café.	11
Tabla 1. 4. Características del aguamiel de café [52].	12
Tabla 1. 5. Composición de las melazas [56].	13
Tabla 2. 1. Concentración celular para cada volumen de inóculo.	21
Tabla 2. 2. Duración de las fases cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. en los diferentes medios.	22
Tabla 3. 1. Caracterización química del AMC.	32
Tabla 3. 2. Productividad de biomasa seca y de lípidos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en aguamiel de café y medio TAP2 antes y después de la fase de producción de lípidos (PL)	42
Tabla 3. 3. Concentración de los principales nutrientes en la melaza.	43
Tabla 3. 4. Productividad de biomasa seca y de lípidos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en melaza y medio TAP3 antes y después de la fase de producción de lípidos (PL).	51
Tabla 3. 5. Contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en los cultivos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	53

## Índice de Figuras

Figura 2. 1. Esquema de la estrategia experimental .....	17
Figura 2. 2. Sistema de cultivo Wheaton, con matraces Celstir y Agitador Biostir 6 modelo III .....	19
Figura 3.1. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1.....	25
Figura 3.2. Concentración celular de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).....	27
Figura 3.3. Producción de biomasa de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).....	28
Figura 3.4. Producción de lípidos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1 durante la fase de producción de lípidos. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).....	29
Figura 3.5. Contenido lipídico de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP1 en la producción de lípidos (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).....	30
Figura 3.6. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en ARS utilizando las formulaciones de Alzate <i>et al.</i> [62](Línea azul) y de Pérez <i>et al.</i> [64](Línea roja).....	30
Figura 3.7. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando diferentes concentraciones de agua miel de café en agua residual sintética .....	33
Figura 3.8. Determinación del volumen de inóculo para el cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en 50% de agua miel de café.....	34
Figura 3.9. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en AMC y medio TAP con inóculos de $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (TAP1) y 20% v/v (TAP2).....	35
Figura 3.10. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. (línea azul) y consumo de nitrógeno en aguamiel de café (línea roja).....	36
Figura 3.11. Comparación de la concentración celular de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL) (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).....	38

Figura 3.12. Producción de biomasa seca de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	39
Figura 3.13. Producción de lípidos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	40
Figura 3.14. Contenido de lípidos (como porcentaje del peso de la biomasa seca) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	41
Figura 3.15. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a diferentes concentraciones de melaza (% v/v) en ARS	44
Figura 3.16. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a diferentes concentraciones de inóculo en 1.5% de melaza	45
Figura 3.17. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. en melaza y medio TAP con inóculos de 10,000 cel·mL <sup>-1</sup> (TAP1) y 5% v/v (TAP3)	46
Figura 3.18. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. (línea azul) y consumo de nitrógeno en melaza (línea roja).	47
Figura 3.19. Comparación de la concentración celular de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	48
Figura 3. 20. Producción de biomasa seca de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	49
Figura 3.21. Producción de lípidos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	50
Figura 3.22. Contenido de lípidos (como porcentaje del peso de la biomasa seca) de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL) (ANOVA, $p \leq 0.05$ ).	51

## Resumen

En la actualidad, la mayoría de los países sostienen su economía con base en el petróleo, cuya combustión ha provocado el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera. Esto ha incentivado la búsqueda de nuevas fuentes de energía. En este sentido, para la producción de biocombustibles a base de lípidos, destaca el cultivo de microalgas, debido a su alto rendimiento lipídico, rápido crecimiento y a que no compiten por el uso de suelo con la producción de alimentos. Pero el cultivo de microalgas presenta algunos inconvenientes, como la gran cantidad de agua y de compuestos inorgánicos utilizados, lo cual incrementa los costos de producción, y los problemas inherentes al escalamiento del proceso. En este trabajo se determinó el efecto de la utilización de los residuos agroindustriales aguamiel de café (AMC) y melaza, ambos en agua residual sintética (ARS), como medios de cultivo para aumentar la producción de biomasa y lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. Las concentraciones de AMC y melaza que permitieron un mayor crecimiento de la microalga fueron 50 y 1.5% v/v, respectivamente. Al llegar los cultivos a la fase estacionaria de crecimiento, aun quedó nitrógeno en ellos, 37 y 32% del nitrógeno inicial en los medios con AMC y melaza, respectivamente. Para favorecer la producción de lípidos, a partir del día 11 de cultivo, se adicionaron más nutrientes con excepción de la fuente de nitrógeno y los cultivos se continuaron por 5 días más. A este periodo se le denominó fase de producción de lípidos (Fase PL) ya que es lo que se pretendió aumentar. Los resultados de producción de biomasa y lípidos obtenidos en ambos medios fueron comparados con los obtenidos en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP), usado como referencia. La producción de biomasa utilizando AMC fue de 2.17 g·L<sup>-1</sup>, un valor similar al obtenido utilizando melaza (2.18 g·L<sup>-1</sup>) y ambos valores fueron mayores que los obtenidos en el medio TAP (1.2 g·L<sup>-1</sup>). La Fase PL provocó una mayor producción de lípidos solamente en el medio TAP. En los medios con AMC o melaza la producción de lípidos se produjo antes de la Fase PL y fue similar a la obtenida en medio TAP, haciendo esta fase innecesaria cuando se utiliza AMC o melaza. La Fase PL produjo cambios en los perfiles de los ácidos grasos en todos los medios de cultivo probados.

## Abstract

At present, the economy of most of the countries is based on oil, which combustion has led to an increase in atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. This problem has stimulated the search for new energy sources and microalgae appear as an option for the production of biofuels due to high lipid yields, fast growth and that their culture does not compete for land use with food production. However, there are some drawbacks on microalgae cultivation; among these, the use of large amounts of running water and inorganic nutrients, which increase production costs [1] and technical issues on culture scale-up. In this work, the effect of the use of two agro-industrial wastes: coffee waste water (CWW) and molasses, both in synthetic wastewater (SW) as culture media to increase biomass and lipid production of the microalga *Scenedesmus* sp. was investigated. The best results were obtained when concentrations of 50 and 1.5% v/v of CWW and molasses were used in SW, respectively. When cultures reached the stationary growth phase, nitrogen was still present in them, 37 and 32% of initial nitrogen content in CWW and molasses, respectively. To stimulate lipid production, nutrients without nitrogen source were added at day 11 to the cultures and they were kept for 5 days more. This period was called the Lipid Production phase (LP phase), as the goal was to increase lipid production. The results obtained with both media were compared with those obtained in TAP (Tris-Acetate-Phosphate) medium, used as reference. Biomass production using CWW was 2.17 g·L<sup>-1</sup>, which was similar to the value obtained with molasses (2.18 g·L<sup>-1</sup>), and higher than that obtained with TAP medium (1.2 g·L<sup>-1</sup>). The LP phase induced an increase in lipid content only in TAP medium. In CWW or molasses media lipid production occurred before the LP phase and was similar to that obtained with TAP medium, making this phase unnecessary when CWW or molasses are used. The LP phase induced changes on fatty acid profiles in all cultures.

## Introducción

En la actualidad, la búsqueda de nuevas opciones para sustituir a los combustibles derivados del petróleo consiste en el aprovechamiento de las energías renovables. Entre éstas se halla el biodiesel, una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadenas largas derivados de biomasa renovable [2].

Los biocombustibles han alcanzado importancia debido a su bajo grado de toxicidad al ambiente (ya que su combustión produce menos emisiones de compuestos orgánicos, como los hidrocarburos aromáticos), así como su baja contribución en la emisión de gases contaminantes y de azufre, comparados con los combustibles fósiles. Es por esto, que se han realizado numerosos estudios acerca de las materias primas para obtener aceites y procesarlos como biodiesel. En un principio se implementó el uso de fuentes para consumo humano como la soya, colza, girasol y cártamo, posteriormente, dada la polémica por su competencia con los alimentos, fue necesario buscar nuevas fuentes de aceite para este propósito. Debido a ello se empezaron a utilizar los aceites de fuentes no convencionales, como es el caso de los aceites vegetales usados, el de *Jatropha curcas*, el de *Madhuca indica*, grasas, sebo, los cuales ya no compiten con los productos que sirven de alimentos [3].

En la actualidad se están estudiando microorganismos capaces de producir lípidos que puedan ser utilizados en la producción de biodiesel. Estos microorganismos, tales como bacterias, levaduras, hongos y microalgas, presentan la ventaja de tener mayores velocidades de crecimiento, necesitar un menor recurso de mano de obra y menos superficie de cultivo comparado con las plantas superiores, por lo que podrían convertirse en potenciales productores de aceites [4].

De estos microorganismos, uno de los más estudiados han sido las microalgas, ya que pruebas de laboratorio demostraron que su grado de producción de aceite es de 10 a 20 veces mayor que el de la palma aceitera y de 200 a 400 veces mayor que el de soya [5], además de presentar una alta absorción de CO<sub>2</sub>. Asimismo, al ser cultivadas en agua, no compiten con el uso de tierra, pudiendo ser cultivadas en espacios terrestres con ambientes extremos y gracias a sus características metabólicas, pueden ser manipuladas para obtener

ventajas de crecimiento y productos intracelulares con un alto valor agregado [6]. Por otro lado, se sabe que si las microalgas son sometidas a un estrés de deficiencia de nitrógeno pueden aumentar considerablemente su producción de lípidos [3,4].

En el presente trabajo, la microalga *Scenedesmus* sp. se cultivó utilizando dos tipos de residuos agroindustriales (aguamiel de café y melaza) en agua residual sintética y se comparó su efecto en la producción de biomasa y lípidos con respecto a la utilización de un medio sintético (TAP).

## **CAPÍTULO 1**

### **ANTECEDENTES**

#### **1.1. Las microalgas**

Las microalgas son organismos fotosintéticos, esto es, organismos capaces de producir oxígeno a partir de la radiación solar, gracias a la ayuda de los cloroplastos en los cuales existen pigmentos (clorofila, ficobilinas, carotenos y xantofilas) que son capaces de capturar la luz del sol y convertirla en energía química [7].

Las microalgas no sólo necesitan la luz solar para producir oxígeno, sino que también requieren de sustancias inorgánicas simples como dióxido de carbono, compuestos nitrogenados y fosforados, que a través del proceso fotosintético son transformados en compuestos orgánicos complejos como carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros. Debido a que las algas tienen un alto contenido de lípidos (por lo regular de 20 a 50% del peso seco) y a su crecimiento exponencial [8], comparadas con las plantas terrestres presentan una excelente opción como fuente de materia prima para producir biodiesel. No obstante se deben de resolver algunos problemas referidos a la viabilidad técnica y costos de producción a nivel comercial [9].

El aprovechamiento de las microalgas no es algo nuevo, ya que pueblos antiguos como los griegos, romanos y chinos, las han utilizado como alimento o con fines terapéuticos. En México, los aztecas las llamaban arnoxtle, tecuítlatl o tecuitlate, que traducido al español quiere decir “excremento de piedra”. Las microalgas las recogían de los márgenes del lago de Tetzoco y formaban una especie de panecillos, que según escritos de españoles aseguraban tener sabor a queso [10].

Actualmente la utilización principal de las microalgas es como alimento para peces, crustáceos y moluscos en granjas acuícolas. Además pueden ser usadas como bioremediación principalmente de aguas residuales [11]. Igualmente se emplean en la producción de nutracéuticos debido a la alta concentración de vitaminas, minerales y proteínas de la biomasa obtenida. Su aplicación en la industria farmacéutica es altamente reconocida ya que ciertas especies pueden producir altas cantidades de ácido icosaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y clorofila [12].

En cuanto a la comercialización del cultivo de microalgas, es un mercado promisorio, ya

que según reporta la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en el 2012 se cultivaron en el mundo 23.7 millones de toneladas (peso húmedo), con un valor de US\$ 6.36 billones. Del cultivo total de plantas acuáticas, el de las micro y macroalgas contribuyó con un 99.5%. Después de los países asiáticos, el que lleva la delantera en cuanto a producción es Chile, con 4,126 toneladas en ese mismo año [13].

Las microalgas tienen un hábitat muy extenso. Pueden vivir en lugares extremos como el hielo o incluso en zonas terrestres, aunque son organismos acuáticos, por lo que se encuentran principalmente en aguas dulces o en océanos, estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos aunque la mayoría se encuentran de forma individual o en conjunto con otras microalgas de la misma especie [14]. Además, las microalgas representan la base de cadena alimenticia acuática [15].

## **1.2. Características generales del género *Scenedesmus***

El género *Scenedesmus* comprende especies de microalgas verdes, comúnmente encontradas en agua dulce y en aguas residuales. Este tipo de microalga, por lo regular forma cenobios de entre 2 a 16 células, con morfología aguda y fusiforme, las cuales se unen de lado a lado en un mismo plano, con los ejes longitudinales paralelos. Tienen reproducción asexual. En este género existen microalgas que pueden presentarse con o sin espinas, las cuales pueden ser largas o cortas, y que le otorgan ciertas características particulares. Cuando es sometida a limitación de nitrógeno forma isogametos [16].

Para que una especie de microalga se considere apta para la producción de biocombustibles debe de cumplir la mayoría de las siguientes características: 1) tener una alta productividad de lípidos; 2) debe de ser capaz de soportar los esfuerzos de corte que se presentan en los fotobioreactores; 3) ser tolerantes a la contaminación; 4) soportar altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y contar con un alto consumo de éste; 5) tener bajo requerimiento de nutrientes; 6) ser tolerante a cambios de temperatura; 7) proporcionar co-productos valiosos; 8) tener un ciclo corto de crecimiento; 9) tener una alta eficiencia fotosintética; 10) presentar características de auto-floculación. Pero se debe de tomar en cuenta, principalmente, la adaptabilidad de la cepa a las condiciones de cultivo, el consumo del CO<sub>2</sub>, la producción de lípidos y de biomasa. Aunque en la actualidad, ninguna cepa de microalga cumple con el total de estas

características para fines de producción de biocombustibles [17]. El género *Scenedesmus* cumple con algunas de estas características de mejor forma que otros como *Botryococcus* y *Chlorella*, según un estudio realizado por Yoo *et al.* [18]. Igualmente, Xin *et al.* cultivaron doce especies de microalgas en agua residual, con poca cantidad de nitrógeno y fósforo (15.5 y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> respectivamente) de las cuales una cepa de *Scenedesmus* sp. presentó mejor adaptabilidad en el medio y mayor producción de biomasa y lípidos [19].

### **1.3. Producción de lípidos para biocombustibles**

Las emisiones de CO<sub>2</sub> que van a la atmósfera por efecto de los contaminantes, son una de las principales causas del calentamiento global. En la actualidad, la concentración de éste gas en la atmósfera ha llegado a un valor crítico superior a 450 ppm, lo que ha ocasionado que la mayoría de los países se enfoquen en tratar de reducir estos niveles, estableciendo el objetivo de reducir este valor en un 10 a 20%. Sin embargo, esto no es suficiente para regular las emisiones de CO<sub>2</sub> a niveles aceptables, al contrario, se espera que los niveles de concentración aumenten para el 2050 a 550 ppm. Para que esto no suceda, se tendrían que bajar los niveles de CO<sub>2</sub> en un 50 a 80%. Una de las opciones para llegar a esta meta, es la utilización de biocombustibles, de los cuales el biodiesel y el bioetanol están siendo muy llamativos en el mercado [20].

Las microalgas prometen ser una fuente favorable para la producción de lípidos, debido a su elevada productividad, así como la capacidad de captar el CO<sub>2</sub> ambiental, además de producir grandes cantidades de lípidos (según sea la especie). El rango del contenido lipídico, va de 4.5 a 80%, esta variación está relacionada con la especie y la etapa de crecimiento en la que se encuentren. El mayor contenido lipídico se obtiene en la fase estacionaria [21, 22]. Por otro lado, la concentración de éstos compuestos también depende de la cantidad de nutrientes, temperatura y luz durante el cultivo de la microalga [21].

En el caso del biodiesel, por ejemplo, datos estadísticos del 2015 muestran que el costo del petrodiesel en E.E.U.U. es de 3.06 US\$.galón<sup>-1</sup> mientras que el biodiesel tiene un costo de 4.02 US\$.galón<sup>-1</sup> [23]. Por esta razón, es indispensable trabajar en la reducción de los costos de la materia prima, ya que ésta corresponde el 70% de los costos de producción del biodiesel. Cultivar microalgas, en la actualidad, implica consumir enormes recursos de agua

corriente, además de que los nutrientes inorgánicos son costosos. En este contexto, se han hecho investigaciones, en donde se agrega carbono orgánico en el cultivo de microalgas heterotróficas, logrando que aumente la productividad de biomasa y lípidos, aunque esto aumenta los costos de producción [1].

Varios estudios han revelado que el contenido lipídico puede ser aumentado cuando las especies son sometidas a algún tipo de estrés, como cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>, salinidad del medio, variación de la temperatura, o un sometimiento al cambio del contenido de nutrientes, siendo la disminución de la cantidad de nitrógeno en el medio lo que favorece un mayor almacenamiento de lípidos [24]. Además de considerar los aspectos ya mencionados, el contenido lipídico es uno de los factores más importantes en la producción de biodiesel de biomasa microalgal, por ello, la elección de la especie de microalga juega un papel determinante para establecer el cultivo [25]. El género *Scenedesmus* puede ser utilizado en la producción de biomasa para biodiesel, ya que su contenido lipídico se encuentra entre 19.6 y 21.1% de biomasa seca [26] pudiendo aumentar hasta 76.9% si se cultiva bajo condiciones de limitación de nitrógeno [27]. Trabajos publicados reportan que las condiciones de cultivo propician un cambio en la concentración de lípidos en la microalga *Scenedesmus* sp. como el realizado por Yoo *et al.* [18] en donde se determinó que con una concentración de 10% de CO<sub>2</sub> se logró un contenido de 11.9% de lípidos en la célula y cuando la concentración de CO<sub>2</sub> disminuyó a 5.5% la cantidad de lípidos aumentó a 18%, mostrando el efecto (en este caso negativo) que este parámetro puede tener en el metabolismo de las células. Li *et al.* [28] concluyeron que a una temperatura de 25 °C se logra un contenido de 25% de lípidos y cuando la temperatura es disminuida a 20 °C el contenido lipídico alcanza hasta 35%. Además, afirmaron que *Scenedesmus* sp. puede crecer a temperaturas tan bajas como 10°C y producir una buena cantidad de lípidos (31% de la biomasa seca). Otros estudios hechos por Xin *et al.* [29] demostraron que las cantidades iniciales de nitrógeno y fósforo en el medio tienen una relación directa en la producción de biomasa y cuando el cultivo es limitado de estos nutrientes en la fase estacionaria, se logra un incremento de hasta un 53% de lípidos.

#### **1.4. Limitación de nitrógeno**

El nitrógeno es el segundo nutriente más importante para las microalgas, puesto que corresponde al 10% de la biomasa. Es el que determina el crecimiento de las microalgas, ya que es necesario para la fijación de CO<sub>2</sub> en cultivos autótrofos o para la asimilación de carbono en cultivos heterótrofos. Además, genera la energía para el ciclo de los ácidos carboxílicos y para la cadena mitocondrial transportadora de electrones. Es por esto que dependiendo de la disponibilidad en el medio, tiene una acción positiva en el aumento de biomasa y negativa en la acumulación de lípidos cuando se encuentra en altas y bajas concentraciones, respectivamente [30].

Como ya se mencionó, el contenido lipídico de las microalgas varía según la especie, los valores varían de entre 4.5 a 80% [21]. Pero las especies de microalgas que logran almacenar mayor cantidad de lípidos por lo regular tienen una tasa de crecimiento muy baja, siendo esta razón, por la que aún no pueden ser consideradas como especies utilizables en la producción de biocombustibles. Las cepas que contienen entre 30 a 50% de contenido lipídico y tienen una tasa de crecimiento alto son consideradas como las idóneas para este fin [25, 31, 32].

El amonio, urea o nitrato, son las fuentes de nitrógeno que las microalgas pueden metabolizar con mayor facilidad. De éstos, la urea y el nitrato son los compuestos que promueven un mayor almacenamiento de lípidos en algunas especies [24]. El estrés por deficiencia de nitrógeno puede incrementar el contenido de lípido intracelular, y se induce en la fase estacionaria, puesto que en esta fase, aparte de alcanzar la mayor cantidad de biomasa, se alcanza la mayor cantidad de glucógeno, carbohidratos y lípidos. El aumento en lípidos es propiciado por la activación de la enzima diacilglicerol aciltransferasa como resultado de un aumento en el contenido intracelular del ácido graso acil-CoA, lo que ocasiona convertir el acil-CoA a triglicéridos. Ocurren tres cambios principales: la disminución del contenido celular de la membrana tilacoidal, la activación de la acilo hidrolasa y la estimulación de la hidrólisis de fosfolípidos [33]. Xin *et al.* [34] reportaron que la limitación de nitrógeno logró aumentar la cantidad de lípidos en una cepa de *Scenedesmus* sp. de 20 a 30%.

### **1.5. Medios de cultivo**

Algunas especies de microalgas, por ser organismos autotrófos, son relativamente fáciles de cultivar en el laboratorio. Pueden ser cultivadas en medios líquidos que consisten básicamente en agua y ciertos compuestos inorgánicos (sales), aunque en algunos casos se deben suministrar elementos traza o algunos factores de crecimiento orgánicos, como el acetato. La principal fuente de carbono es el CO<sub>2</sub>. En algunos casos, cuando se quiere obtener un rendimiento de biomasa mayor, los cultivos son complementados con alguna otra fuente de carbono. Además, la luz es un elemento esencial para el cultivo de éstas, la cual puede ser artificial, aunque es necesario regular su intensidad, longitud de onda, y la producción de calor. Si se emplea luz natural, debe haber una buena ventilación ya que el incremento de la temperatura en la superficie podría propiciar tanto una disminución celular como la evaporación del medio de cultivo [11]. La temperatura es otro factor para el desarrollo de las microalgas, sin embargo para la mayoría de las especies, mantenerlas a una temperatura ambiente es suficiente (22 a 27 °C) [35].

En particular, cepas de microalgas del género *Scenedesmus* han sido cultivadas en diversos medios sintéticos a nivel laboratorio, entre los cuales destacan: BG11, Bold's Basal, N-11, N-9 y TAP [36, 37, 28, 38, 39, 40]. Además, esta especie se ha sometido a estudios en agua residual sintética para determinar su adaptación a este medio. También se ha probado su utilidad en aguas residuales tanto domésticas como industriales para la remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo [41, 42, 43].

### **1.6. Agua residual**

Las aguas residuales domésticas e industriales son causa de serios problemas de contaminación y de la eutrofización de los cuerpos de agua, que provocan la muerte de algunos ecosistemas acuáticos. Es por esto que es necesario el cuidado y tratamiento de estas aguas, para recuperarlas y asegurar que el ciclo hidrológico no se vea afectado. Con esta finalidad, se han diseñado diversos tipos de tratamientos para aguas residuales: el primario consiste en una separación mecánica de sólidos por sedimentación, flotación y/o neutralización; en el secundario es donde se realiza la degradación bacteriana de la materia orgánica presente, por medio de lagunas de oxidación o de estabilización. Como

consecuencia, estos tratamientos traen consigo la generación de efluentes con elevadas concentraciones de nutrientes, además de la presencia de agentes patógenos, por lo que se hace necesario aplicar un tercer proceso fisicoquímico para eliminarlos, como la precipitación, intercambio iónico, remoción de nutrientes y de metales pesados, cloración y ósmosis inversa, que son procesos fisicoquímicos muy costosos [44].

Uno de los principales problemas con la mayoría de las aguas residuales es el alto contenido de nutrientes, principalmente N y P además de metales tóxicos. Los métodos terciarios más utilizados para eliminar estos contaminantes son el procesamiento químico de los residuos y la generación de lodo activado, los cuales son procesos costosos [45]. En México, según SEMARNAT (2013), la generación de estas aguas en el 2012 fue de 229.73 m<sup>3</sup>/s de las cuales solo se trató el 43.42% (Tabla 1.2.)[46].

**Tabla 1. 1. Agua residual en México [46].**

Año	Agua residual generada (m <sup>3</sup> /s)	Agua residual tratada (m <sup>3</sup> /s)	Agua residual tratada (%)
2010	235.08	93.6	39.81
2011	236.35	97.64	41.31
2012	229.73	99.75	43.42

Por esto, una de las opciones para tratar las aguas residuales es la utilización de microalgas, debido a su capacidad de remover cantidades significativas de N y P [47]. Además de absorber estos nutrientes, las microalgas también pueden absorber metales pesados. La microalga verde *Chlorella vulgaris* ha sido probada en la absorción de iones de plomo presentando una efectividad entre 64.2 y 100% [48].

La biomasa de microalgas puede emplearse con otros objetivos, aparte del de biorremediación, por ejemplo como una fuente de químicos o de pigmentos. También puede utilizarse para la obtención de biocombustibles [45]. Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* son utilizados en los tratamientos de este tipo de aguas para la remoción de nutrientes (N y P). En la tabla 1.2 se citan algunos países que están tratando las aguas

residuales con microalgas [41].

**Tabla 1. 2. Tratamiento de aguas residuales en lagunas de alta tasa de oxidación [41]**

Países	Influente	Géneros de microalgas	Productividad de biomasa (g·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup> )
Israel	Municipal doméstico	<i>Scenedesmus, Euglena y Chlorella</i>	44.2
Taiwán	digerido porcino	<i>Spirulina, Chlorella</i>	15-25
India	orina humana	<i>Spirulina</i>	10-12
India	melaza (caña)	<i>Scenedesmus</i>	15-20
Tailandia	tapioca	<i>Spirulina</i>	7-10
Singapur	desecho porcino	<i>Cultivo mixto</i>	5.4-5.0
E.U.	estiércol de ganado	<i>Chlorella</i>	30
Malasia	aceite de coco	<i>Chlorella</i>	2.7-12.8
Brasil	doméstico	<i>Scenedesmus, Chlorella</i>	10-27

Desde que Caldwell [49] propuso la utilización de las microalgas para biorremediar aguas residuales, se han realizado muchos estudios con diferentes especies, entre las cuales destacan las del género *Scenedesmus*. La microalga *Scenedesmus* sp. ha sido utilizada en la remoción de diversos nutrientes en aguas residuales, como lo realizado por Park *et al.* [42] quienes cultivaron esta especie en agua residual de estiércol de cerdo y se probó la remoción de hasta un 70% de amonio y un 100% de fósforo. También existen trabajos en donde se ha probado la inmovilización de *Scenedesmus* sp. en alginato (polisacárido proveniente de algas marinas) para el tratamiento de aguas residuales domésticas [43].

### 1.7. Residuos agroindustriales para el enriquecimiento del medio de cultivo

El aguamiel de café (AMC) y la melaza son residuos agroindustriales que pueden ser utilizados en el cultivo de microalgas ya que contienen nutrientes que pueden ser

aprovechados por éstas. En este trabajo se utilizaron estos residuos en ARS para el cultivo de la microalga *Scenedemus* sp.

### 1.7.1. Residuos de la industria del café

El café es una de las bebidas más importantes del mundo y esto es gracias al alcaloide estimulante que contiene: la cafeína. Para su consumo el grano debe de ser secado, tostado y molido. La planta fue cultivada por primera vez en las montañas del noreste africano y en la actualidad se puede cosechar en todas las regiones cálidas del mundo. Gracias a este cultivo, 25 millones de personas en el mundo pueden obtener su sustento, además de ser una de las entradas principales de divisas para las 50 naciones tropicales que lo exportan [50].

El fruto del cafeto se encuentra constituido por: pulpa (pericarpio), mucílago (mesocarpio), pergamino (endocarpio), estrado plateado (espermodermo) y semilla (endospermo). De estos, los subproductos húmedos, a los que se le puede sacar algún tipo de beneficio son: la pulpa, el mucílago y el pergamino. La pulpa es la parte del fruto que se le puede sacar mayor provecho. Esta se encuentra constituida por el epicarpio y el mesocarpio del fruto; representa el 40% del peso total del mismo y tiene una humedad del 85%. Su composición es variable. En la Tabla 1.3 se encuentran las principales sustancias presentes en la pulpa del café [51].

**Tabla 1. 3. Sustancias contenidas en la pulpa del café**

<b>Componente</b>	<b>% (peso seco)</b>
Cafeína	0.95
Polifenoles	2.9
Azúcar total	4.1
Proteína bruta	13.3
Grasa total	1.73
Lignina	19.3
Celulosa	18.3
Materia orgánica degradable	55.0
Minerales	9.7

Para procesar el café existen dos vías, la húmeda y la seca, de las cuales la húmeda presenta un mayor rendimiento de la calidad del producto. Durante todo el proceso del café, se utilizan grandes cantidades de agua, especialmente en la eliminación mecánica de la pulpa, representando más de la mitad del agua utilizada durante todo el proceso. Dichas aguas son ricas en sólidos suspendidos y disueltos (Tabla 1.4). Si estas aguas son desechadas, sin ningún tratamiento, en los afluentes limpios, los contaminan gravemente; lo que sucede cotidianamente, puesto que las tecnologías de los tratamientos convencionales son muy caras [51, 52]. En la industria del café, a estas aguas se les denomina aguamiel, debido a la tonalidad que presentan. Se producen entre 8,000 y 20,000 L por tonelada de café cosechado [53].

**Tabla 1. 4. Características del aguamiel de café [54]**

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>
Color (CU)	470 - 640
Sólidos totales disueltos (mg·L <sup>-1</sup> )	1130 - 1380
Sólidos totales suspendidos (mg·L <sup>-1</sup> )	2390 - 2820
Sólidos totales (mg·L <sup>-1</sup> )	3520 - 4200
pH	3.88 - 4.11
Conductividad eléctrica (dS·m <sup>-1</sup> )	0.96 - 1.20
Oxígeno disuelto (mg·L <sup>-1</sup> )	2.0 - 2.6
Demanda bioquímica de oxígeno (mg·L <sup>-1</sup> )	3800 - 4780
Demanda química de oxígeno (mg·L <sup>-1</sup> )	6420 - 8480
Razón DBO:DQO	0.56 - 0.59
Carbono orgánico total (%)	0.36 - 0.48
Nitrógeno (mg·L <sup>-1</sup> )	125.8 - 173.2
Fósforo (mg·L <sup>-1</sup> )	4.4 - 6.8
Potasio (mg·L <sup>-1</sup> )	20.4 - 45.8

### 1.7.2. Características de la melaza

La melaza es un residuo de la industria azucarera y existen diferentes tipos. Van desde la que contiene todo el azúcar (rica), hasta la que resulta al término del proceso de extracción en el ingenio (final). Por esta razón, ambos grupos presentan diferencias significativas entre ellos, en cuanto a la composición química se refiere. La melaza se utiliza principalmente en la alimentación de ganado vacuno. Para esto, la más utilizada es la melaza final y fue en Cuba en donde se comenzó a aprovechar con este objetivo. Posteriormente se reprodujo en México, Jamaica y Santo Domingo [55]. En la tabla 1.5 se presentan las características encontradas en estudios hechos en melaza. En su composición química, la melaza, cuenta con alto contenido de azúcares totales, los cuales pueden representar una fuente de carbono para el cultivo de microalgas.

**Tabla 1. 5. Composición de las melazas [56]**

<b>Componente</b>	<b>Valor</b>
Materia seca (%)	76.7
Nitrógeno (%)	0.0232
Densidad (g/L)	1360
Azúcares totales (g/Kg <sub>melaza</sub> )	836
Sacarosa (%)	51.50 ± 0.23
Glucosa (%)	9.59 ± 2.13
Fructosa (%)	4.05 ± 0.08
Materia volátil (%)	86.3

## Justificación

Entre las nuevas fuentes de energía destaca la producción de biocombustibles a partir de lípidos. Las microalgas, debido a su alto rendimiento lipídico y rápido crecimiento comparados con los cultivos energéticos y a que no compiten por el uso de suelo con la producción de alimentos, han sido consideradas una buena opción para la producción de lípidos [3, 4, 5, 6].

Por otro lado, las aguas residuales (domésticas y agroindustriales), presentan altos contenidos de nutrientes que causan la contaminación en los mantos acuíferos.

Se ha comprobado la utilidad de la microalga *Scenedesmus* sp. en el tratamiento de estas aguas, en las que reducen el exceso del contenido de N y P presentes, ya que esta especie los utiliza como elementos para su crecimiento [9, 44, 57, 58]. Además de ofrecer la oportunidad de disminuir la cantidad de estos nutrientes presentes en el agua residual, las microalgas del género *Scenedesmus* pueden acumular lípidos cuando son sometidas a una deficiencia de N, una vez que alcanzan la fase estacionaria de su crecimiento, por lo que podría ser cultivada para la producción de biocombustibles [29, 59].

La utilización de dos residuos agroindustriales que se producen en México, como el aguamiel de café y la melaza, podrían ser utilizados en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos.

## **Hipótesis**

El uso de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética, permitirá un crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. comparable al obtenido en medio TAP para la producción de lípidos transesterificables, los cuales podrán incrementarse por deficiencia en el aporte de nitrógeno en el medio.

### **Objetivo General**

Determinar el efecto de la utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en la producción de biomasa y lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. y los cambios en el perfil de lípidos cuando el cultivo se extiende sin agregar fuente de nitrógeno.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar la producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguamiel de café o melaza en agua residual sintética con respecto al medio TAP.
- Determinar la producción de lípidos y el perfil lipídico utilizando aguamiel de café o melaza en agua residual sintética.
- Evaluar el efecto en la producción de lípidos y en el perfil lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. cuando el cultivo se extiende sin agregar fuente de nitrógeno.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. Estrategia experimental

La estrategia que se utilizó para conseguir los objetivos de este trabajo se presenta en la siguiente figura:

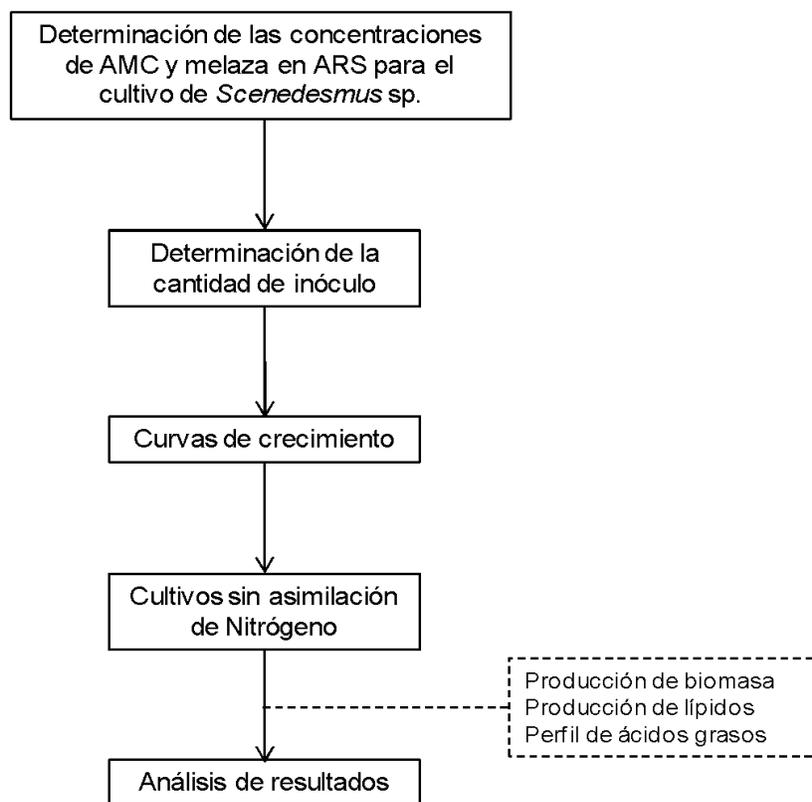


Figura 2. 1. Esquema de la estrategia experimental

## **2.2. Material biológico**

La cepa *Scenedesmus* sp. (UADY-PRIORI-014-FMVZ-05) aislada en el parque Ecológico Brisas en el Poniente de Mérida, Yucatán, fue proporcionada por la Q.F.B. Silvia J. López Adrián miembro del Departamento de Botánica del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, para este estudio.

## **2.3. Medios de cultivo**

El medio utilizado como referencia fue el medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, por sus siglas en Inglés) [60, 61, 62] cuya formulación se encuentra en el Anexo A.

El agua residual sintética (ARS) se preparó según la fórmula de Alzate *et al.* (2007) indicada en el Anexo A [63], se ajustó el pH a un valor de 7 con HCl 1M y se esterilizó en autoclave a 121°C y 110 kPa de presión por 20 minutos.

El aguamiel de café (AMC) fue donado por la Sra. Hortencia Ruiz Marina, y se obtuvo de los efluentes del rancho cafetalero “Salitral” municipio de La Concordia, Chiapas, México, y se mantuvo en refrigeración a 4°C por 1 mes.

La melaza se obtuvo del ingenio azucarero “La Joya” del municipio de Champotón, Campeche, México, la cual fue recolectada y donada por la Dra. Liliana Alzate Gaviria, de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y se mantuvo en refrigeración a 4°C por 24 meses.

## **2.4. Cultivo de las microalgas**

Para establecer el cultivo de microalgas primeramente se realizó un precultivo en medio líquido. Para ello, de un cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio semi-sólido, se tomó una colonia y se inoculó en un matraz de 50 mL con 10 mL de medio TAP por un período de 4 días. Después, el cultivo fue realizado en matraces de 250 mL con 50 mL de medio por 4 días con un inóculo de 10,000 células·mL<sup>-1</sup> provenientes del precultivo antes descrito. Los experimentos de producción de biomasa y lípidos se realizaron en matraces tipo Celstir (marca Wheaton, Figura 2.2.) con un volumen de trabajo de 250 mL, utilizando un agitador magnético “Wheaton Biostir 6 model III” a 150 rpm.

Todos los cultivos se realizaron a una temperatura de 25 ± 2 °C, un fotoperiodo de 16:8

(luz:oscuridad) y una radiación fotosintéticamente activa de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (medida con un medidor de luz marca LI-COR modelo LI250 equipado con un sensor Quantum) proporcionada por una lámpara de luz blanca de 30 W de la marca Philips.



Figura 2. 2. Sistema de cultivo Wheaton, con matraces Celstir y Agitador Biostir 6 modelo III

Las curvas de crecimiento en medio TAP se realizaron con 3 cantidades de inóculo:  $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (TAP) que se utilizó en los experimentos preliminares,  $2\ 160,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (TAP2) para comparar con los experimentos con AMC y  $540,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (TAP3) para comparar con los experimentos utilizando melaza.

### 2.5. Determinación del tipo de agua residual sintética

Se probaron dos formulaciones de ARS: Alzate *et al.* [63] y Pérez *et al.* [64], las cuales se encuentran en el anexo A. Se utilizaron matraces Celstir con un volumen de trabajo de 250 mL de medio. Los medios se esterilizaron en autoclave a  $121\ ^\circ\text{C}$  y 1.1 bar de presión por 20 minutos. Se utilizó un inóculo de  $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La concentración celular se monitoreó cada 24 h hasta que se observó que los cultivos habían alcanzado la fase estacionaria.

## **2.6. Aguamiel de café en agua residual sintética**

Para determinar la cantidad adecuada de AMC en ARS para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. se realizaron curvas de crecimiento en matraces de 50 mL con 10 mL de medio, en donde se varió la cantidad de AMC en 10, 30, 50, 80% v/v y solo AMC. El pH del AMC se ajustó a un valor de 7 con KOH 1M. Se observó que por las condiciones de esterilización en autoclave, el AMC pasó de un color amarillo claro a café oscuro por lo que se decidió desinfectarlo por exposición a radiación UV por un período de 3 h con una lámpara de 30 W de la marca Germicidal antes de mezclarlo con el ARS. Se tomaron muestras de 500  $\mu$ L cada 24 h y se determinó la concentración celular hasta llegar a la fase estacionaria.

## **2.7. Melaza en agua residual sintética**

Para determinar la cantidad adecuada de AMC en ARS para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. se realizaron curvas de crecimiento en matraces de 50 mL con 10 mL de medio, en donde se varió la cantidad de melaza en 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% v/v. El pH del medio se ajustó a un valor de 7 con HCl 1M y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 110 kPa de presión por 20 minutos. Se tomaron muestras de 500  $\mu$ L cada 24 h y se determinó la concentración celular, hasta llegar a la fase estacionaria.

## **2.8. Determinación del volumen de inóculo.**

Debido a que se necesitó una concentración alta de células para poder realizar los cultivos en los residuos, los inóculos se manejaron en volúmenes de precultivo con respecto al volumen total de medio. En la tabla 2.1. se indica la concentración celular resultante con cada porcentaje de inóculo.

En los cultivos con AMC se probaron volúmenes de inóculo de 5, 10, 15, 20 y 25%. En el caso de la melaza los volúmenes de inóculo probados fueron 2.5, 5, 10, y 15%. Se realizaron curvas de crecimiento (según el procedimiento antes mencionado) hasta llegar a la fase estacionaria.

**Tabla 2. 1. Concentración celular para cada volumen de inóculo.**

Volumen de inóculo (%)	Concentración celular x 10 <sup>6</sup> (cel·mL <sup>-1</sup> )
2.5	0.27
5	0.54
10	1.08
15	1.62
20	2.16
25	2.7

### **2.9. Conteo celular**

Para determinar la concentración celular se tomó una muestra de 500 µL y se agitó durante 1 minuto con la ayuda de un agitador vórtex. Seguidamente se colocó una muestra en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, y mediante un microscopio óptico provisto de un objetivo 40X se contó el número de células. Para calcular la concentración celular se aplicó la fórmula utilizada por Us [62].

### **2.10. Recolección y productividad de biomasa**

La recolección de la biomasa de *Scenedesmus* sp. se llevó a cabo en 5, 11, 13, 14, 16, y 21 días de cultivo, dependiendo del tratamiento realizado, mediante centrifugación, a 4000 rpm, durante 10 minutos, a una temperatura de 4 °C. La biomasa obtenida se congeló a -80 °C por 24 horas y se deshidrató en una liofilizadora Labconco Modelo 77530 por 24 horas. La biomasa seca se pesó en una balanza analítica y la productividad de biomasa (mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) se calculó en función de la variación de biomasa (mg·L<sup>-1</sup>) con respecto al tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P = (X_1 - X_0) (t_1 - t_0)^{-1} \quad (1)$$

Donde  $X_1$  y  $X_0$  son las concentraciones de la biomasa (mg·L<sup>-1</sup>) con respecto al día de cultivo  $t_1$  y  $t_0$ , respectivamente.

### 2.11. Experimentos de producción de lípidos.

Constaron de dos fases. En la primera, los cultivos se llevaron hasta el final de la fase exponencial con la formulación completa para cada medio. Los cultivos continuaron a una segunda fase de producción de lípidos (Fase PL), en la que se adicionó 20 mL de una solución concentrada de nutrientes (sin NH<sub>4</sub>Cl) que al diluirse en el medio proporcionó la concentración requerida por cada formulación.

Las fases de cultivo en los medios TAP, AMC y melaza tuvieron diferente duración. En la tabla 2.2. se presenta la duración de cada fase de los cultivos.

**Tabla 2. 2. Duración de las fases cultivo de *Scenedesmus* sp. en los diferentes medios.**

Medio	Duración de las fases de cultivo (d)	
	Fase de crecimiento	Fase PL
TAP	5	16
AMC	11	5
Melaza	11	5

### 2.12. Extracción de lípidos

Los lípidos totales se extrajeron mediante lixiviación, con una mezcla cloroformo-metanol 2:1 v/v, añadiendo 30 mL de la mezcla de solvente por cada 76 mg de biomasa seca [61]. Estas extracciones se llevaron a cabo en matraces de 250 mL, en una incubadora a 38 °C con agitación a 150 rpm por 3 horas. La extracción se realizó tres veces. Posteriormente se recuperó el lixiviado, se evaporaron los solventes en un evaporador rotatorio marca IKA<sup>®</sup> RV10 y se pesó el extracto resultante.

La productividad de lípidos (mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) se calculó en base a la cantidad de extracto de lípidos obtenidos por unidad de tiempo [62].

### 2.13. Transesterificación

El extracto de lípidos se disolvió en 2 mL de n-heptano y se tomó una alícuota de 500 µL como referencia. A los 1.5 mL restantes del extracto se le añadieron 300 µL de metóxido de

sodio al 2% y 300  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo. Finalmente la mezcla se colocó en baño María a una temperatura de 60  $^{\circ}\text{C}$  por 1.5 horas en agitación. Las muestras transesterificadas se pasaron por una columna de resina de intercambio iónico para eliminar impurezas (exceso de catalizador y glicerol) [66].

#### **2.14. Cromatografía de gases**

Para el estudio se usó un cromatógrafo modelo Clarus 500 (Perkin Elmer<sup>®</sup>), equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna Varian Capillary Colum Select<sup>™</sup> Biodiesel for FAME (30m x 0.32mm D.I. x 0.25 $\mu\text{m}$  espesor de película). Se utilizó nitrógeno (0.48 bar) como gas acarreador a un flujo constante de 80  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra. Las condiciones de análisis fueron como sigue: temperatura inicial del horno de 180  $^{\circ}\text{C}$ . Después de dos minutos, se aplicó una rampa de elevación de temperatura de 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 250  $^{\circ}\text{C}$ , y se mantuvo a esta temperatura durante 25 minutos. La temperatura del inyector fue de 270  $^{\circ}\text{C}$  y la del detector de 300  $^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron estándares para la cuantificación de los ésteres metílicos formados durante la transesterificación, éstos fueron: éster metílico del ácido mirístico, éster metílico del ácido palmítico, éster metílico del ácido esteárico, éster metílico del ácido oleico y el éster metílico del ácido linoleico. Se utilizó la técnica del estándar externo [67].

#### **2.15. Determinación de nitrógeno total**

La concentración de nitrógeno presente en las muestras de los residuos agroindustriales, se determinó por el método de colorimetría, utilizando un colorímetro modelo DR/890 Colorimeter (HACH<sup>®</sup>) y el digestor modelo DRB 200 (HACH<sup>®</sup>), siguiendo las indicaciones del fabricante del kit para nitrógeno total (10 a 150 mg N/L, método número 8075). Se tomaron muestras de 1.5 mL del cultivo cada 2 días en tubos Eppendorf, durante la duración de la curva de crecimiento, y se centrifugaron usando una picofuga marca IKA mini G. por 10 min a 6000 rpm

### **2.16. Determinación de fosfatos**

La concentración de fosfatos en las muestras de residuos agroindustriales se determinó por el método de colorimetría, utilizando un colorímetro modelo DR/890 colorimeter (HACH®) y el digestor modelo DRB 200 (HACH®), siguiendo las indicaciones del fabricante del kit para Fósforo total (0 a 3.5 mg/L  $PO_4^{-3}$ , método número 8190). Se tomaron muestras de 1.5 mL en tubos Eppendorf.

### **2.17. Determinación de sulfatos**

La concentración de sulfatos presentes en las muestras de residuos agroindustriales se determinó por el método de colorimetría, utilizando un colorímetro modelo DR/890 Colorimeter (HACH®) y el digestor modelo DRB 200 (HACH®). Se siguieron las indicaciones del fabricante del kit para Sulfatos totales (0 a 70 mg/L, método número 8051). Se tomaron muestras de 1.5 mL en tubos Eppendorf.

### **2.18 Determinación de azúcares reductores**

El contenido de azúcares reductores se determinó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [68, 69], utilizando glucosa como estándar para la curva de calibración, según el Anexo A.

### **2.19. Análisis Estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para comparar de la concentración celular, producción de biomasa, producción de lípidos, concentración de lípidos, productividad de biomasa y productividad de lípidos, respecto al tiempo y entre tratamientos, se realizó un análisis estadístico (ANOVA de dos vías) con el software Statgraphic Plus 4.1 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, Estados Unidos) utilizando un intervalo de confianza del 95%.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Curva de crecimiento en medio TAP1

Se realizó la curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 (Figura 3.1.) para poder identificar el punto de inicio de la fase estacionaria, ya que es donde se alcanza la máxima concentración celular, además era necesario conocer el tiempo que la cepa se mantiene en esta fase con la finalidad de determinar el punto de inicio y la duración de la fase de limitación de nitrógeno. En trabajos anteriores con el género *Scenedesmus* [62, 24] la duración de la fase de limitación fue de 5 y 7 días, por esta razón no se monitoreó el cultivo hasta la fase de muerte.

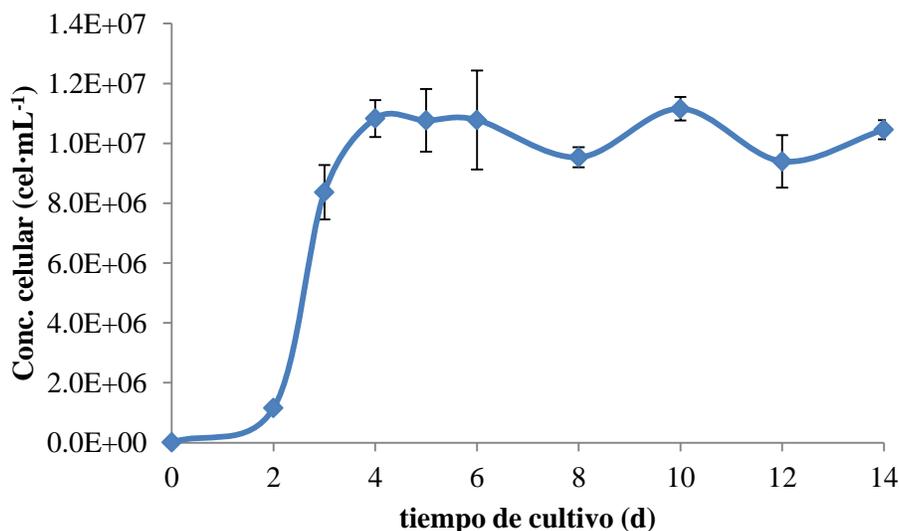


Figura 3.1. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1

Como se observa en la figura 3.1., el cultivo presentó un periodo de adaptación de 2 días, posterior a este punto, ocurrió una fase de crecimiento exponencial que se prolongó hasta el día 4, manteniéndose la concentración celular sin cambios significativos hasta el final del

cultivo (14 días). Us [62], utilizando la misma cepa, el mismo medio de cultivo y la misma temperatura, pero realizando el cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio con una intensidad lumínica de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , también reportó una fase de adaptación de dos días y una fase de crecimiento exponencial de 4 días. La diferencia es que en el trabajo de Us, la microalga siguió creciendo a una velocidad más lenta hasta los 14 días. En el presente trabajo se obtuvo una concentración celular de  $1.04\times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  la cual es 5.2 veces mayor que la reportada por Us [62]. Es posible que esta diferencia se deba al efecto de la agitación entre los dos experimentos. Los matraces Celstir tienen una agitación mecánica que hace que el cultivo (medio y células) sea más homogéneo propiciando que la disponibilidad de nutrientes y la iluminación, entre los factores más importantes, sean más eficientes, posibilitando una mayor multiplicación. Para corroborar esta hipótesis es necesario hacer otros experimentos, lo cual queda fuera del alcance de los objetivos del presente trabajo.

### **3.2. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos**

Este experimento se realizó para tener una referencia del comportamiento de la cepa entre el cultivo en un medio definido y los cultivos con AMC y melaza.

#### **3.2.1. Concentración celular**

En la figura 3.2. se puede observar que la concentración de células al final de la fase de crecimiento fue de  $1.25 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Durante toda la etapa de producción de lípidos la concentración celular se mantuvo constante, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las muestras tomadas a los 8 y 16 días de producción ( $p \leq 0.05$ ). Este comportamiento concuerda con la literatura [70], donde se menciona que durante un estrés por limitación de nitrógeno, el carbono en el medio es empleado para la síntesis de reservas de energía (carbohidratos y lípidos) y no para la reproducción de células.

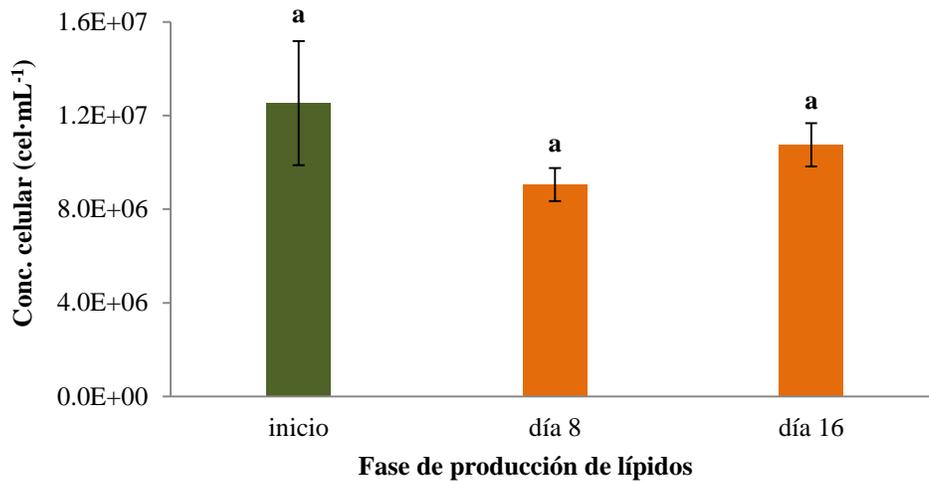


Figura 3.2. Concentración celular de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.2. Producción de biomasa

En cuanto a la biomasa seca, los resultados (Figura 3.3.) muestran que para el día cinco de cultivo (inicio de la fase de producción de lípidos) se obtuvo un rendimiento de biomasa de  $0.52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A los 8 días en producción de lípidos, la cantidad de biomasa incrementó a un valor de  $1.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y para el último muestreo tomado a los 16 días se obtuvo  $1.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo estos dos últimos valores estadísticamente iguales.

Este resultado es similar a lo obtenido por Lin *et al.* [24] quienes encontraron que después de iniciado un periodo de estrés por deficiencia de nitrógeno, la cantidad de biomasa aumenta en un cultivo de la microalga *Scenedesmus rubescens*.

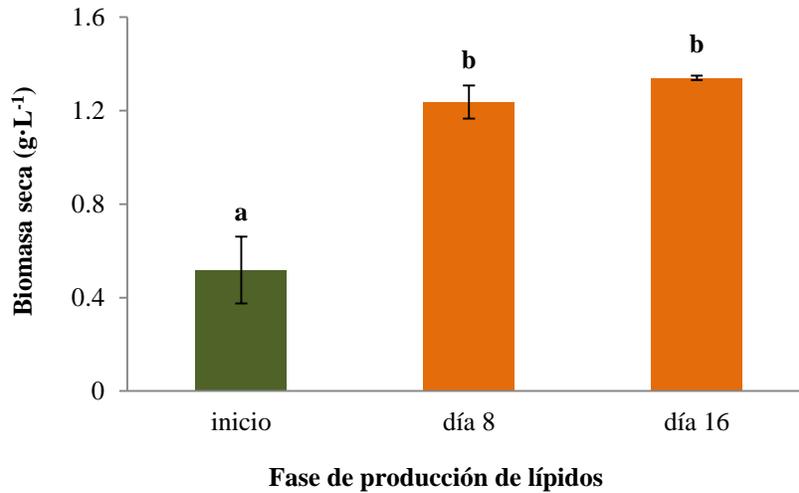


Figura 3.3. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 en la fase de producción de lípidos. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.3. Producción de lípidos

Como se puede observar en la figura 3.4, la muestra tomada al inicio de la fase de producción de lípidos tuvo un contenido de  $0.243 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (2.43%). Después de 8 días se obtuvo un incremento de  $0.481 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (4.81%) y para el último muestreo (16 días en producción) el contenido de lípidos fue de  $0.580 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (5.8%). Es posible que el aumento de peso seco se deba al aumento de los lípidos producidos. Se ha reportado [34] que una producción de lípidos alta ( $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) es consecuencia de una alta producción de biomasa ( $0.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) cuando cultivos de *Scenedesmus* sp. fueron sometidos a deficiencia de nitrógeno. En este trabajo, el análisis estadístico ( $p \leq 0.05$ ) indicó que hay un aumento significativo de lípidos durante los primeros 8 días de producción de lípidos, manteniéndose sin cambio hasta el final del cultivo.

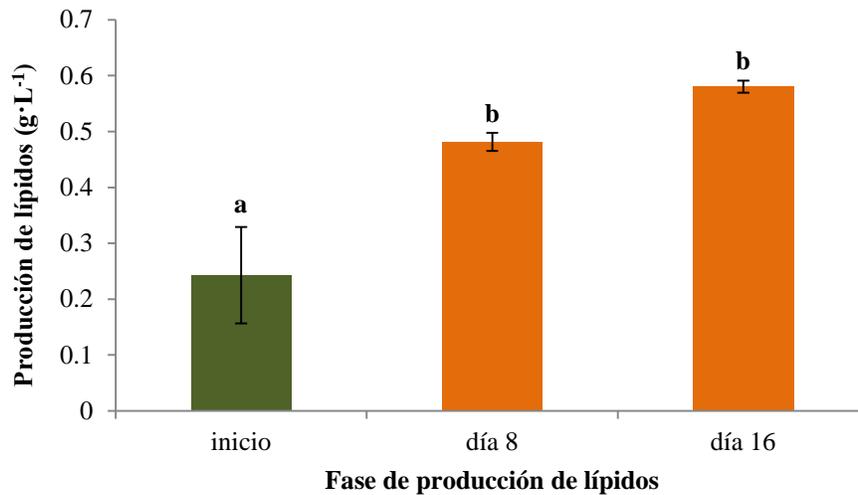


Figura 3.4. Producción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 durante la fase de producción de lípidos. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

#### 3.2.4. Contenido de lípidos

Generalmente el contenido de lípidos se reporta como porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa [24]. El contenido de lípidos al inicio de la producción de lípidos fue de 46.38%. A los ocho días se obtuvo un porcentaje de 38.95% y a los 16 días el porcentaje de lípidos fue de 43.29%, como se observa en la figura 3.5. El análisis estadístico indicó que el porcentaje lipídico no varió durante la fase de producción de lípidos (valor de  $p \leq 0.05$ ).

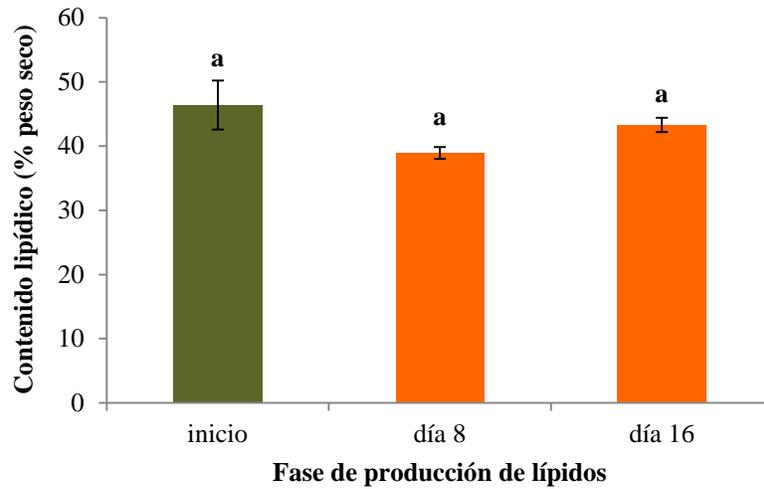


Figura 3.5. Contenido lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP1 en la producción de lípidos (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Curvas de crecimiento en agua residual sintética

Se realizaron curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en las dos formulaciones de ARS consideradas en el presente trabajo (Figura 3.6).

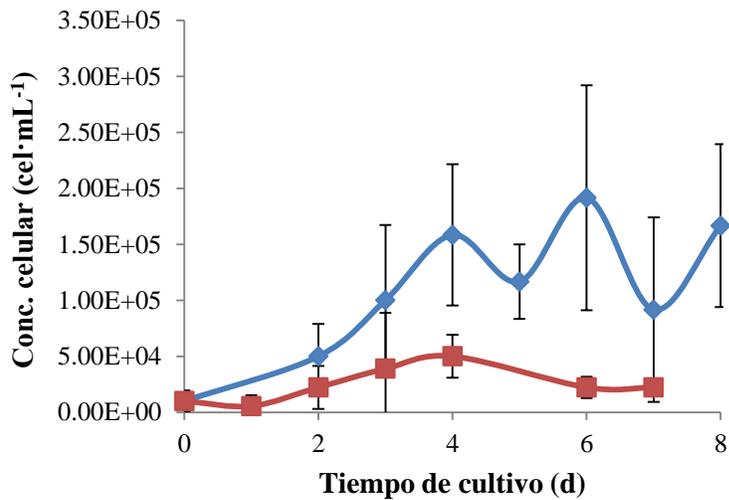


Figura 3.6. Curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en ARS utilizando las formulaciones de Alzate *et al.* [63] (línea azul) y de Pérez *et al.* [64] (línea roja)

Se pudo observar que la fase de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. no presentó el comportamiento exponencial y la concentración celular obtenidos en la curva de crecimiento en medio TAP, el cual produjo una concentración celular 50 veces mayor. Un resultado similar se obtuvo cuando se comparó el crecimiento de una cepa de *Scenedesmus* entre un medio sintético rico (Bold Basal) y un agua residual (de la industria de la Tilapia), donde la cepa creció mejor en el medio sintético, ya que es más rico en nutrientes [71]. Esto también concuerda con el trabajo realizado por Núñez *et al.* [49], quienes obtuvieron una concentración de hasta  $7.4 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup> al establecer un cultivo de *Scenedesmus obliquus* en un ARS enriquecida con vitaminas y minerales traza del medio “f” descrito por Guillard-Ryther.

Lo que resulta interesante es haber obtenido una mayor concentración celular con el ARS formulada según Alzate *et al.* [63] ya que emplea azúcar comestible (sacarosa), y la formulación de Pérez *et al.* [64] utiliza glucosa en mayor cantidad (el doble). Se ha reportado en la literatura [18] que un exceso de la fuente de carbono puede inhibir el crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii*. Determinar el efecto de los componentes de las ARS utilizadas en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. estuvo fuera del alcance del presente trabajo.

Debido a que de las dos formulaciones de ARS probadas en este trabajo, la de Alzate *et al.* [63] presentó una mayor concentración celular, se eligió para ser empleada en los experimentos posteriores.

#### **3.4. Caracterización del aguamiel de café**

En la tabla 3.1 se presentan los resultados de la caracterización química del AMC.

**Tabla 3. 1. Caracterización química del AMC**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
pH	3.9
Azúcares reductores ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	3.9
Nitrógeno ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	230
Fosfatos ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	5.4
Sulfatos ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	7

El AMC resultó ser un medio ácido, como lo indica el valor del pH igual a 3.9. Como las microalgas son cultivadas en medios neutros [26], la adición de AMC al ARS hizo necesario el ajuste del pH a un valor de 7. El AMC tiene cantidades similares de azúcares, cuatro veces menos de nitrógeno y 37 veces menos de fosfatos que el ARS. Esta última no contiene sulfatos, aunque el AMC tiene cantidades pequeñas. Se probaron diferentes mezclas de AMC en ARS para determinar en cuál de ellas crece mejor la microalga *Scenedesmus* sp.

### **3.5. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando AMC**

#### **3.5.1. Determinación de la concentración de agua miel de café en agua residual sintética.**

En la figura 3.7 se presentan las curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando diferentes proporciones de AMC en agua residual sintética (10, 30, 50, 80% v/v) y AMC sola (100%), utilizando un inóculo del 20% (v/v).

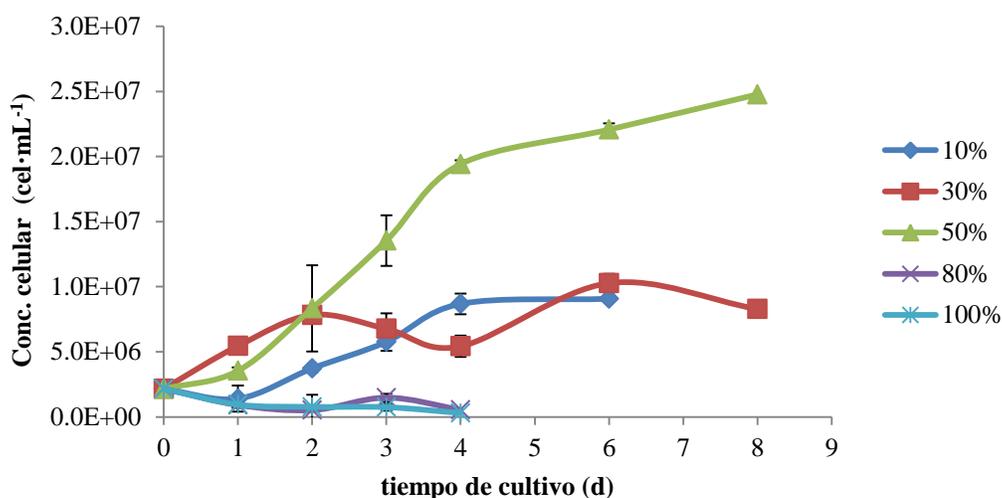


Figura 3.7. Curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando diferentes concentraciones de agua miel de café en agua residual sintética

Como se observa en la figura 3.7, en las mezclas de AMC de 10 y 30%, las concentraciones celulares al día 6 de cultivo, son similares ( $9.1 \times 10^6$  y  $1.0 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> respectivamente), pero cuando la concentración de AMC incrementa a un 50%, la concentración celular se incrementa a  $2.2 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup>, llegando así a más del doble de lo obtenido en las concentraciones de 10 y 30%. En las concentraciones de 80 y 100% de AMC no hubo crecimiento celular por lo que los cultivos solamente se mantuvieron hasta el día 4. Estos resultados demuestran que hay un efecto de la concentración de AMC en el crecimiento de la microalga y que contiene algún compuesto, que a concentraciones mayores del 50% se encuentra en exceso y provoca una inhibición del crecimiento, tal como lo reportaron Li *et al.* [22], que un exceso de nutrientes en el medio propició la inhibición del crecimiento de la microalga *Neochloris oleoabundans*. También se ha reportado [72] una disminución de la concentración de biomasa celular de la microalga *Chlorella* sp. debido a un exceso de nutrientes cuando se cultivó en agua residual doméstica.

A las concentraciones de 80 y 100% de AMC los medios se observaron más oscuros. En la literatura [73], se ha documentado que la turbidez del medio puede afectar negativamente el crecimiento de las microalgas, por lo que se recomiendan diluciones del medio para evitar la inhibición. Utilizando 50% (v/v) de AMC, se obtuvieron las concentraciones celulares más altas.

### 3.5.2. Determinación del volumen de inóculo

Como el AMC no se pudo esterilizar por autoclave, para evitar el crecimiento de otras especies se tuvo que utilizar un inóculo mayor a  $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Por ello, ensayos preliminares indicaron que se debían probar diferentes volúmenes de inóculo, en porcentajes de 5, 10, 15, 20, y 25% del volumen total de cultivo (Figura 3.8). Se ha reportado [18] que incrementando la cantidad de inóculo, se favorece la adaptación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivos con una alta concentración de  $\text{CO}_2$ .

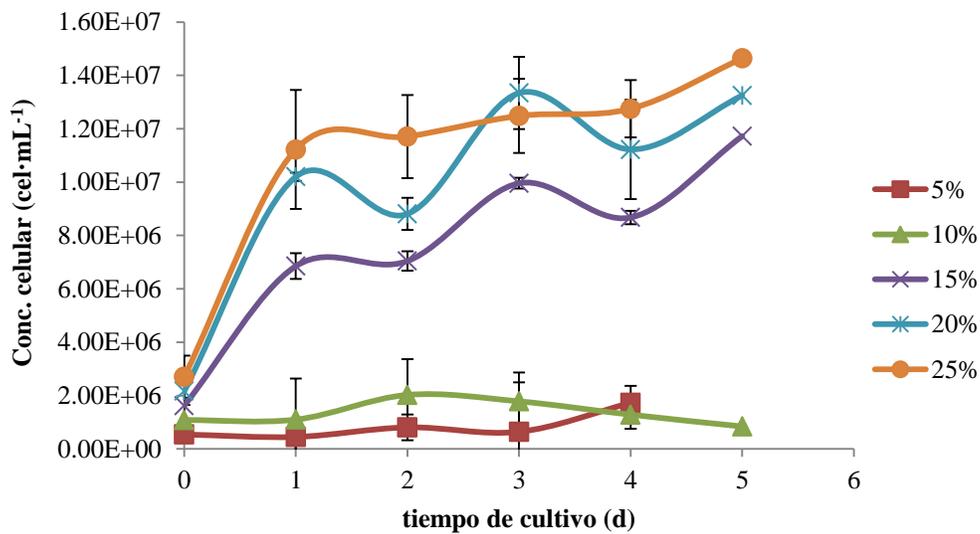


Figura 3.8. Determinación del volumen de inóculo para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en 50% de agua miel de café.

Se puede observar que conforme se incrementó la concentración de inóculo, la concentración celular al final del cultivo fue mayor, lo que sugiere que la especie se adaptó con mayor facilidad al medio cuando inicia con un mayor número de células. Ya se ha reportado que incrementar el inóculo es una manera de lograr el cultivo de microalgas. Yoo *et al.* [74], reportaron que un incremento de la cantidad de células al inicio del cultivo favorece a la adaptación de las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* en un medio con alta concentración de  $\text{CO}_2$ . En este trabajo, un volumen de inóculo de 20% permitió un buen crecimiento de la microalga y no diluye demasiado el medio de cultivo.

### 3.5.3. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en aguamiel de café

Una vez determinada la cantidad de AMC (50% v/v) y el volumen de inóculo (20%), se realizó la curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp. en este medio, y como referencia se realizaron curvas de crecimiento utilizando medio TAP1 y TAP2 (Figura 3.9.).

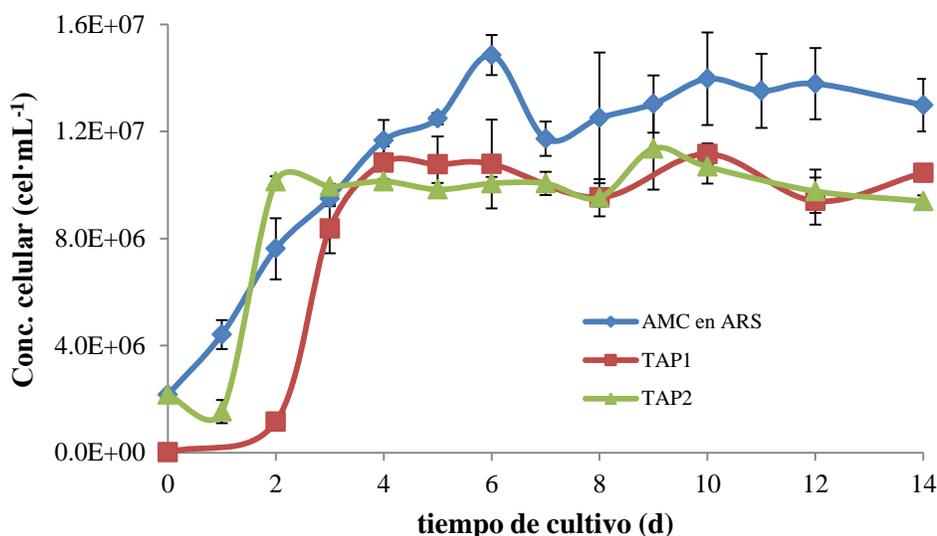


Figura 3.9. Curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en AMC y medio TAP con inóculos de  $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (TAP1) y 20% v/v (TAP2)

En la curva de crecimiento utilizando AMC, no se observó un período de adaptación, dando inicio la fase de crecimiento exponencial desde el primer día de cultivo y concluyó al día 6 seguida de una fase estacionaria que se mantuvo durante 8 días. El medio TAP1 presentó una fase de adaptación de 2 días, seguida por la fase exponencial, la cual tuvo una duración de 2 días. El medio TAP2 presentó una fase de adaptación de 1 día y la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de 1 día. Como se mencionó en el apartado anterior, una concentración de inóculo mayor puede propiciar una mejor adaptación de la microalga al medio [74], en este caso, se observó una fase de adaptación más corta. Hasta los 14 días de cultivo no se presentó una fase de muerte celular, por lo que se decidió parar los cultivos. Las concentraciones celulares al final de los cultivos fueron mayores cuando se utilizó AMC que en los medios TAP1 y TAP2 ( $1.3 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  y  $0.9 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente; Anova,  $p \leq 0.05$ ). No se encontró en la literatura trabajos en los que se haya utilizado AMC como medio para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

### 3.5.4. Consumo de nitrógeno de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en aguamiel de café.

Se realizó un cultivo de la cepa *Scenedesmus* sp. para evaluar el consumo de nitrógeno y poder determinar el tiempo al que se puede iniciar la fase de disminución de este nutriente, ya que se requiere que la cepa haya dejado de consumirlo y que no haya multiplicación celular para la producción de lípidos. Como se puede observar en la figura 3.10, aunque la cepa llega a la fase estacionaria (día 6), sigue habiendo consumo de nitrógeno del medio por 4 días más. Al final del cultivo se consumió alrededor de un 60% del nitrógeno presente.

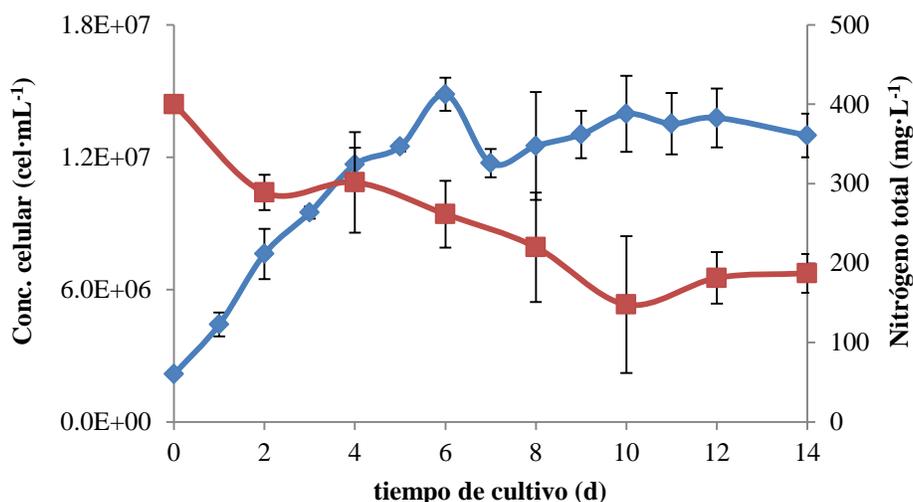


Figura 3.10. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. (línea azul) y consumo de nitrógeno en aguamiel de café (línea roja).

Este resultado concuerda con el reportado por Xin *et al.* [34], quienes reportan un consumo del 60% de nitrógeno por la microalga *Scenedesmus* sp. en un medio que contenía 25 mg·L<sup>-1</sup> de este nutriente inicialmente. Estos autores indican que la relación N/P tiene un efecto importante en la asimilación del nitrógeno por la microalga y que cuando ya no lo asimila es porque ya hay una deficiencia de fósforo. La tendencia de la curva de consumo de nitrógeno indica que la microalga ya no lo consume en el día 10 de cultivo, por lo que se estableció el día 11 como el tiempo para adicionar más nutrientes excepto la fuente de

nitrógeno. Como en el medio todavía quedó una cantidad importante de nitrógeno, al adicionar nuevamente nutrientes (entre ellos fósforo), es posible que la microalga haya asimilado nitrógeno nuevamente. Esto no pudo ser corroborado en este trabajo, lo que sí se confirmó, fue que durante esta fase no hubo crecimiento celular.

### **3.5.5. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en aguamiel de café para la producción de lípidos.**

Una vez identificado el tiempo en que la microalga deja de asimilar nitrógeno (día 11 de cultivo) se procedió a adicionar más nutrientes (sin la fuente de nitrógeno) y se mantuvo el cultivo por 5 días más, después de los cuales se recuperó la biomasa para el análisis de lípidos. Esta fase de 5 días que se consideró la de producción de lípidos fue llamada Fase PL para facilidad de lectura. La microalga también se cultivó bajo las mismas condiciones, en medio TAP2, como referencia.

#### **3.5.5.1. Concentración celular**

En la figura 3.11. se muestran las concentraciones celulares del cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp en AMC, así como en medio TAP2. Para ambos medios, se puede observar que una vez que se alcanza la máxima concentración celular al final de la fase de crecimiento exponencial, esta se mantiene hasta el final del cultivo. El análisis estadístico indicó que no hay diferencias significativas entre el inicio y final de la Fase PL en los cultivos, ni tampoco entre el cultivo en AMC y el medio TAP. Esta respuesta ya se había observado en los experimentos anteriores de cultivo de la microalga en medio TAP1 utilizando un inóculo de  $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Al final de la Fase PL se obtiene una concentración celular de  $1.19 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el medio con AMC.

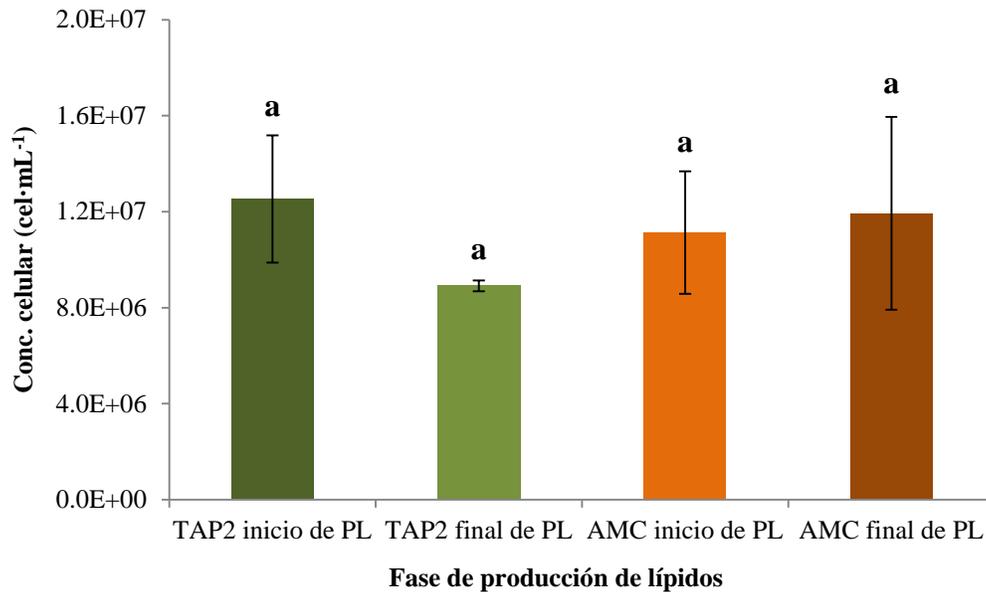


Figura 3.11. Comparación de la concentración celular de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL) (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.5.5.2. Producción de biomasa seca

En la figura 3.12 se muestran los resultados de producción de biomasa al final de la Fase PL. Al utilizar AMC como medio para cultivar la microalga *Scenedesmus* sp. se obtiene más biomasa que utilizando medio TAP2. Al final de la fase exponencial de crecimiento se produjo un 76% más de biomasa en AMC que en medio TAP2 y después de la Fase PL, la diferencia fue del 40% más de biomasa en el medio AMC. Estos resultados son similares a lo reportado por Liang *et al.* [75] quienes obtuvieron una producción de biomasa seca de la microalga *Chlorella vulgaris* de 1.6 g·L<sup>-1</sup> utilizando glucosa como fuente de carbono y que fue mayor que cuando se utilizó acetato. En este estudio, la formulación de ARS incluye sacarosa (4 g·L<sup>-1</sup>) y ácido acético (0.5 g·L<sup>-1</sup>) y el AMC tiene una cantidad similar de azúcares reductores, lo que hace que en el medio hayan carbohidratos disponibles que la microalga puede utilizar.

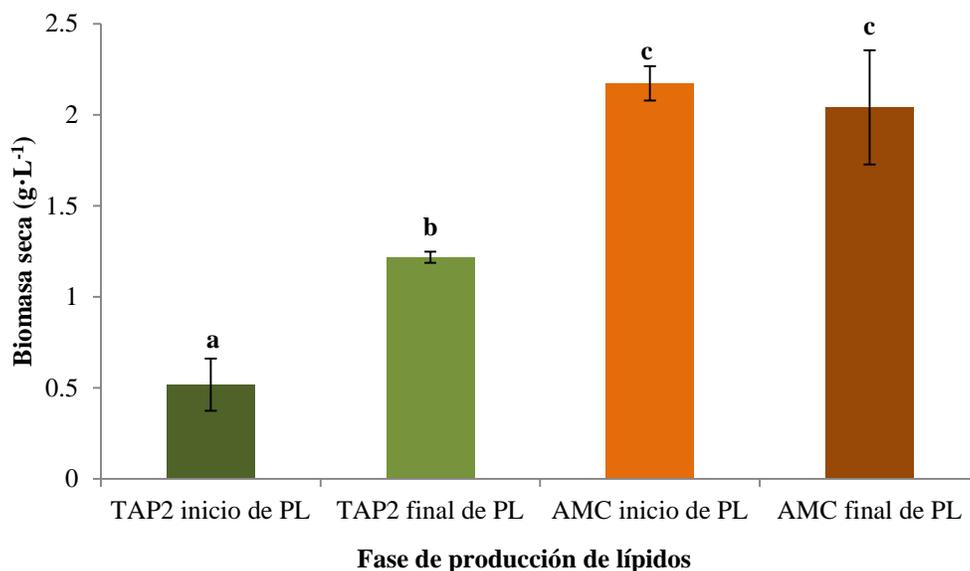


Figura 3.12. Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

Se pudo observar que en medio TAP2 hay un aumento de biomasa seca al final de la Fase PL. Si hubo un aumento en biomasa pero no hubo aumento de la concentración celular, quiere decir que en medio TAP2 la microalga está almacenando metabolitos (lípidos) en lugar de multiplicarse, tal como se ha reportado en la literatura [36]. En el caso de la utilización de AMC como medio de cultivo, la biomasa alcanzada al final de la fase de crecimiento exponencial fue de  $2.172 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y después de la disminución el resultado fue de  $2.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , valores estadísticamente iguales por lo que se infiere que la producción de metabolitos pudo haber ocurrido antes de la Fase PL. Es necesario realizar más experimentos para explicar estos resultados.

### 3.5.5.3. Producción de lípidos

El cultivo de la microalga durante la Fase PL propició que se duplique la producción de lípidos en el medio TAP2 para quedar en  $0.683 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (6.83%). En el caso del AMC, no hubo un aumento estadísticamente significativo en la producción de lípidos durante esta fase y se obtuvo una producción de lípidos de  $1.097 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (10.96%) (Figura 3.13).

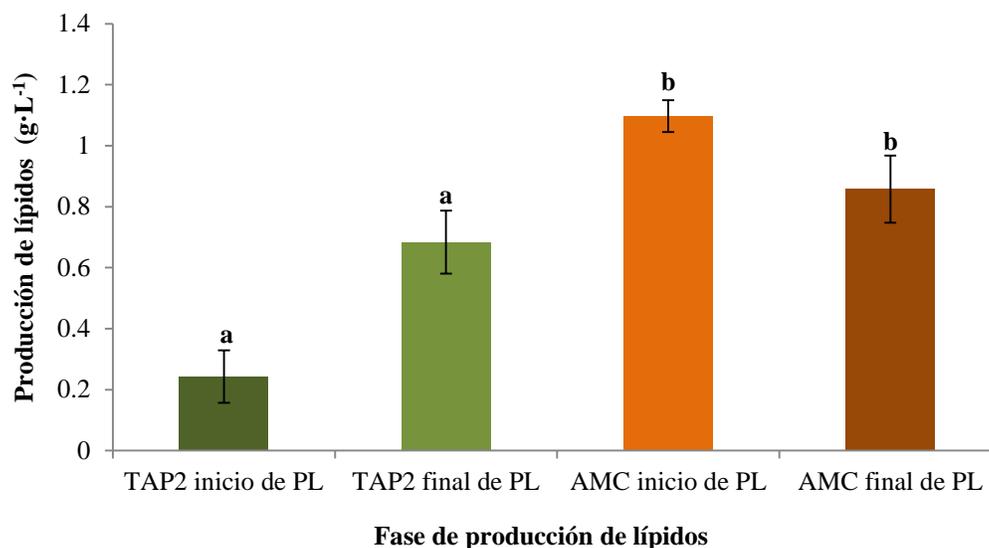


Figura 3.13. Producción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

Se ha reportado que las microalgas acumulan lípidos durante la fase de limitación de nutrientes siempre que los otros se encuentren en cantidades suficientes [80], lo cual concuerda con los resultados obtenidos con el medio TAP2. Pero cuando se usó AMC, la máxima producción de lípidos se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial y mantener el cultivo por más tiempo no tuvo efecto en su producción. Es interesante notar que en ambos medios se alcanzaron concentraciones celulares similares, por lo que se infiere que las células cultivadas en AMC presentaron producciones de biomasa y de lípidos mayores que las cultivadas en TAP2.

Los resultados obtenidos con el medio TAP2 concuerdan con lo reportado en la literatura, pero en el caso del AMC tal parece que durante la fase de crecimiento también hay producción de lípidos. Mandal y Mallick [31] mencionan que durante el crecimiento si hay una producción de lípidos, aunque la producción máxima se alcanza durante la fase estacionaria. Es necesario realizar más experimentos para determinar las causas de este comportamiento.

El contenido lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. aumentó ligeramente en el medio TAP2 y no cambió en el medio con AMC durante la Fase PL (Figura 3.14).

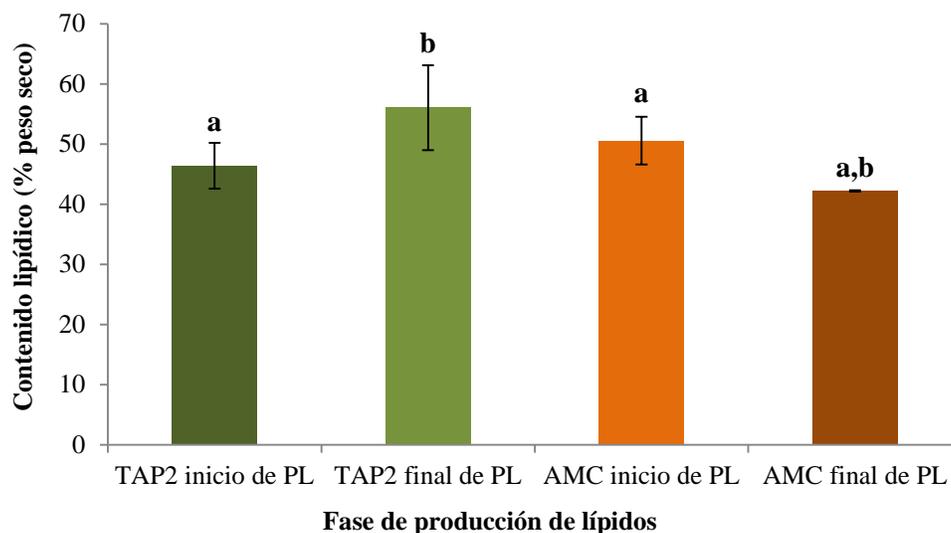


Figura 3.14. Contenido de lípidos (como porcentaje del peso de la biomasa seca) de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en aguamiel de café y en medio TAP2 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ )

Los valores se mantuvieron entre 40-56%. En trabajos anteriores, se han reportado contenidos lipídicos después de un cultivo con limitación de nitrógeno de 43% [31] con la microalga *S. obliquus* y 42.9% con la microalga *Scenedesmus* sp. [62]. En nuestro grupo de trabajo, se ha reportado que la fase de limitación de nitrógeno en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP no tuvo efecto en el contenido lipídico, el cual fue de 45.6% [76].

#### 3.5.5.4 Efecto de la fase de producción de lípidos en la productividad de biomasa y lípidos de *Scenedesmus* sp. en AMC

En la tabla 3.2 se presentan los valores de la productividad de biomasa seca y lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp. en los cultivos de AMC y TAP2 obtenidos antes y después de la fase de producción de lípidos.

**Tabla 3. 2. Productividad de biomasa seca y de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en aguamiel de café y medio TAP2 antes y después de la fase de producción de lípidos (PL)**

Medios de cultivo	Productividad de biomasa seca (g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Productividad de lípidos (g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )
TAP2 inicio de PL	0.104 ± 0.029	0.049 ± 0.017
TAP2 final de PL	0.092 ± 0.002	0.055 ± 0.009
AMC inicio de PL	0.179 ± 0.009	0.093 ± 0.005
AMC final de PL	0.062 ± 0.019	0.03 ± 0.006

Se puede observar que en el medio TAP2 no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los valores de la productividad de biomasa ( $p \leq 0.05$ ) antes y después de aplicar la fase de producción de lípidos. Esto se debió a que durante esta fase hubo una producción de biomasa. En AMC, durante la fase de producción de lípidos no hubo aumento significativo de biomasa, lo que hace que al aumentar el tiempo del cultivo al aplicar esta fase, la productividad sea más baja. Esto indica que continuar el cultivo por más tiempo, agregando nutrientes sin fuente de nitrógeno tiene un efecto negativo en la productividad de biomasa. Se han reportado productividades de biomasa en un rango de 0.09 a 0.21 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> [77] para diferentes géneros de microalgas, los resultados de este trabajo se encuentran entre los reportados en la literatura. En cuanto a la productividad de lípidos, en el medio TAP2 se observó el mismo fenómeno que con la productividad de biomasa. La fase de producción de lípidos favorece positivamente la productividad de lípidos ( $p \leq 0.05$ ) y lo contrario cuando se utiliza AMC. Ya se ha reportado que el estrés por deficiencia de nitrógeno puede disminuir levemente la productividad de biomasa e incrementar la productividad de lípidos [33]. Por otro lado, se puede observar que los valores de productividad tanto de biomasa como de lípidos en AMC antes de la fase de PL, son mayores que los obtenidos en medio TAP al final de esta etapa. Se puede concluir que en el caso de AMC, no es necesaria la fase de PL, o debe aplicarse antes del tiempo utilizado en este trabajo. Griffiths *et al.* [78] reportaron que la productividad de lípidos se puede considerar alta cuando se tienen valores por arriba de 0.1 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, utilizando AMC

se obtuvieron valores cercanos, por lo que se puede considerar que se obtuvo una productividad de lípidos aceptable.

### 3.6. Caracterización de la melaza

Se realizaron pruebas de caracterización química de la melaza a utilizar, para verificar la cantidad de nitrógeno, sulfato, fósforo, así como de los azúcares reductores que encuentran presentes (Tabla 3.2) con el fin de establecer la cantidad de este residuo agroindustrial que puede ser utilizada junto con el ARS.

**Tabla 3.3. Concentración de los principales nutrientes en la melaza**

<b>Compuestos</b>	<b>Concentración</b>
Azúcares reductores ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	310.8
Nitrógeno ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	5100
Fósforo ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	700
Sulfato ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1300

La concentración de azúcares reductores resultó más alta comparada con las concentraciones de azúcares que se han probado en el cultivo de microalgas, entre  $0.02$  y  $0.225 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  [31], por lo que tiene que usarse diluida para evitar una posible inhibición del crecimiento de la microalga. Al ser un residuo altamente concentrado, las concentraciones de los diferentes nutrientes son más altas que en el AMC.

### 3.7. Cultivo en Melaza

#### 3.7.1. Determinación de la concentración de melaza en agua residual sintética

Se realizaron curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en las que se monitoreó la concentración celular hasta llegar a la fase exponencial de cada una de ellas (Figura 3.15).

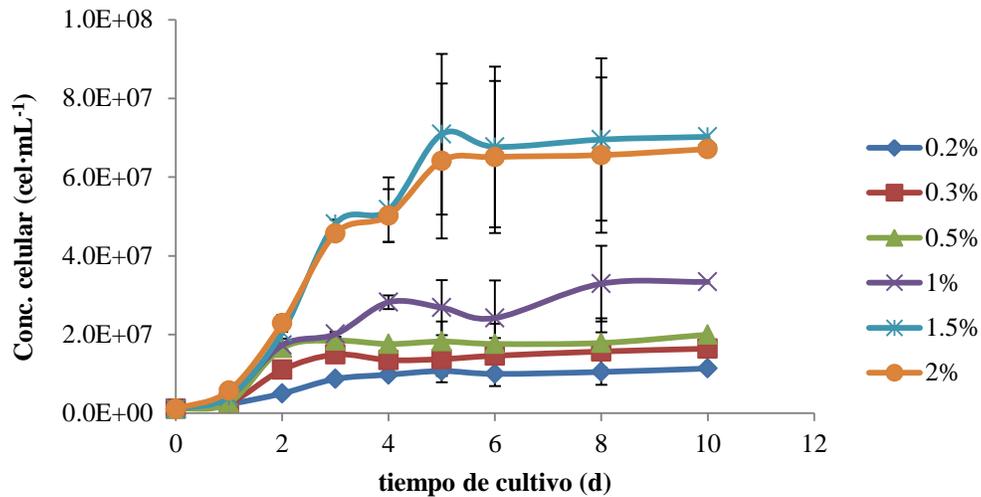


Figura 3.15. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. a diferentes concentraciones de melaza (% v/v) en ARS

La figura 3.15, la concentración celular aumentó con respecto al incremento en la concentración de melaza. Las mayores concentraciones celulares se alcanzaron cuando se utilizó 1.5% y 2% de melaza. Por tal motivo, se planteó la mezcla 1.5% de melaza como la adecuada para cultivar la microalga *Scenedesmus* sp. Este comportamiento se debe a que con el aumento de la cantidad de melaza, van aumentando las concentraciones de los nutrientes y se produce un aumento en la concentración celular. Se ha reportado [32] que en un cultivo, tanto el crecimiento celular y la biosíntesis de los productos celulares están influenciados significativamente por la concentración de los nutrientes. Al utilizar 2% de melaza ya no hubo aumento de la concentración celular, lo que indica que a estos niveles alguno de los compuestos presentes empieza a ser inhibitorio.

### 3.7.2. Determinación del volumen de inóculo

El volumen de inóculo tiene un efecto en la adaptación de la microalga a altas cantidades de nutrientes [18], por ello se varió el volumen de inóculo como se indicó en la metodología, ver sección 2.8, para determinar cuál favorece una mayor adaptación de la cepa *Scenedesmus* sp. en el medio con 1.5% de melaza (Figura 3.16).

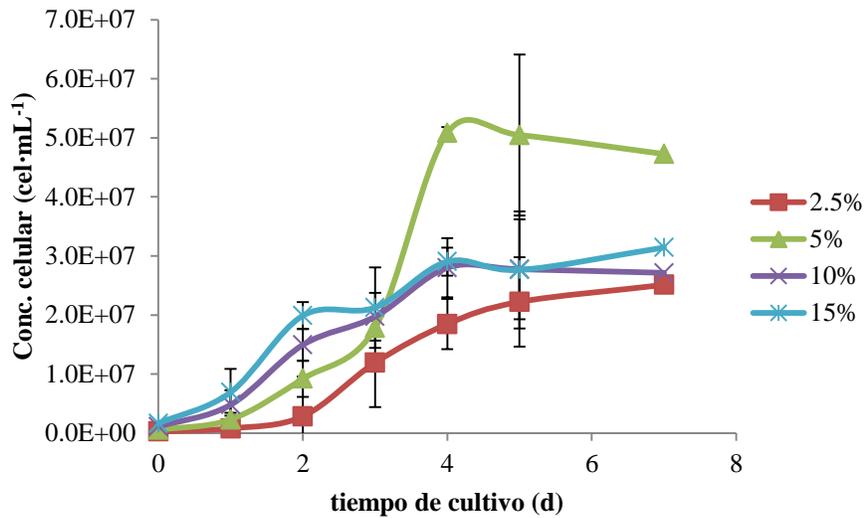


Figura 3.16. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. a diferentes concentraciones de inóculo en 1.5% de melaza

Los resultados muestran que la curva de crecimiento con 2.5% de inóculo muestra un periodo de adaptación más largo (2 días) que con los otros inóculos (1 día). Pasado este periodo, los cultivos continuaron a una fase exponencial, la cual se extendió hasta el día 4, dando inicio a la fase estacionaria. Con el 5% de inóculo se obtuvo la mayor concentración celular por lo que se utilizó este valor para los experimentos posteriores en este estudio. También se pudo observar que utilizar porcentajes superiores a 5% de inóculo repercute en forma negativa en la concentración celular. Esto puede deberse a que al ser mayor la población inicial, se produce un desabasto más rápido de los nutrientes en el medio de cultivo, provocando competencia y frenando el crecimiento. En la literatura [70] se ha reportado que entre los factores que disminuyen el crecimiento se encuentran la disponibilidad de la luz, ya que al ser mayor el crecimiento celular, hay una obstrucción al paso de la luz hacia los microorganismos, también puede deberse al cambio de pH del medio, ya que al ser consumidos rápidamente los nutrientes, hay un incremento rápido en el pH lo que propicia la inhibición del crecimiento celular.

### 3.7.3. Curvas de crecimiento con melaza

Una vez determinada la cantidad de inóculo (5% v/v) y la proporción de melaza (1.5% v/v), se realizó la curva de crecimiento y se comparó con cultivos en medio TAP1 y TAP3 (Figura 3.17).

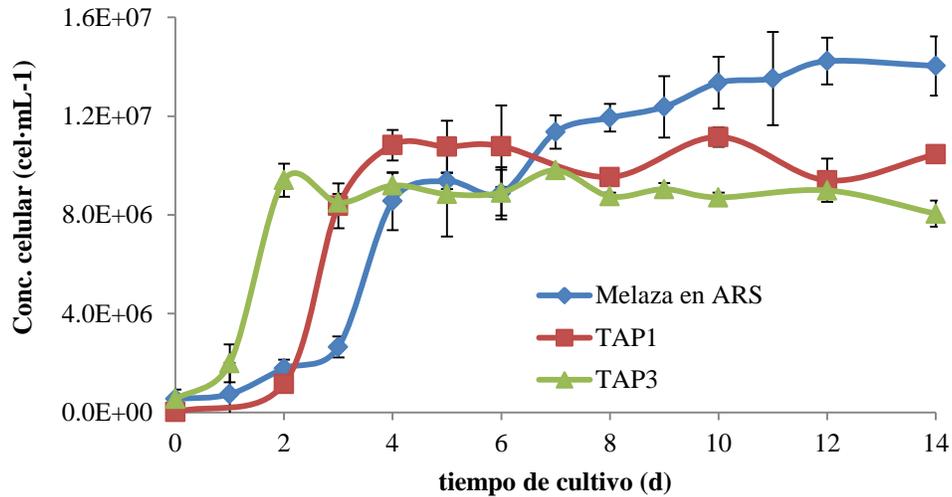


Figura 3.17. Curvas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en melaza y medio TAP con inóculos de 10,000 cel·mL-1 (TAP1) y 5% v/v (TAP3)

El cultivo en medio TAP3 fue el que presentó una fase de adaptación más rápida que los otros dos cultivos. Aunque la cepa cultivada en melaza tardó más en adaptarse al medio, presentó una concentración celular mayor al final del experimento (Anova,  $p \leq 0.05$ ). Al día 6 de cultivo, se observó una concentración celular similar entre los cultivos en melaza y TAP3, lo que indica que la melaza en ARS puede ser un buen medio de cultivo para la microalga *Scenedesmus* sp.

### 3.7.4. Consumo de nitrógeno de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en melaza

Para determinar el punto de inicio del proceso de disminución de nitrógeno cuando la microalga *Scenedesmus* sp. es cultivada en melaza, se monitoreó la concentración de nitrógeno total durante la curva de crecimiento (Figura 3.18).

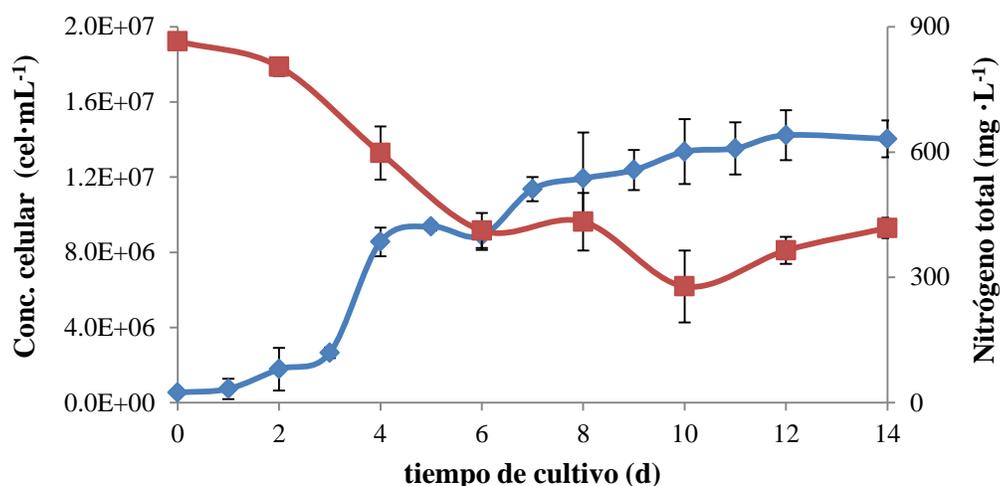


Figura 3.18. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. (línea azul) y consumo de nitrógeno en melaza (línea roja).

Se puede observar que durante la fase de crecimiento exponencial hubo una disminución marcada de la concentración de nitrógeno hasta el día 6 de cultivo cuando el consumo disminuyó y coincidió con el tiempo al cual la cepa alcanzó la etapa estacionaria. A los 14 días de cultivo se consumió el 48% del nitrógeno presente inicialmente en el medio. Al igual que con el cultivo en AMC, al día 11 de cultivo ya no se observa más disminución de la concentración de nitrógeno, por lo que se decidió que a este tiempo se adicionaran más nutrientes excepto nitrógeno.

### 3.7.5. Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en melaza para la producción de lípidos (Fase PL)

Siendo el día 11 de cultivo cuando la microalga deja de asimilar nitrógeno, se procedió a adicionar más nutrientes (sin el aporte de nitrógeno) y se mantuvo el cultivo por 5 días más para inducir la producción de lípidos. Esta fase fue llamada Fase PL para facilidad de lectura. La microalga también se cultivó bajo las mismas condiciones, en medio TAP3, como referencia.

### 3.7.5.1. Concentración celular

En la figura 3.19 se puede observar que la concentración celular en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. se mantuvo entre  $0.8 \times 10^7$  y  $1.6 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> durante la fase de producción de lípidos en melaza y TAP3. Estos valores son similares a los obtenidos en los cultivos con AMC. En el caso de la melaza, se puede observar que sí hubo una diferencia estadísticamente significativa al final de esta fase entre el medio TAP3 y el medio con melaza. Es posible que durante esta fase, la mayor cantidad de carbohidratos en la melaza y ARS haya hecho posible que la concentración celular se mantuviera en los valores alcanzados al final del crecimiento exponencial.

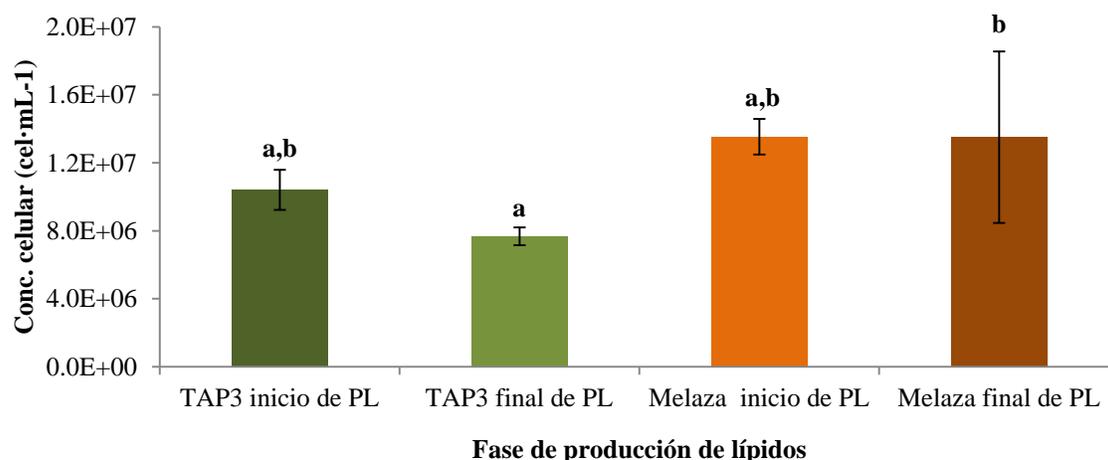


Figura 3.19. Comparación de la concentración celular de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.7.5.2. Producción de biomasa

En la figura 3.20 se observó un efecto similar de la Fase PL al obtenido utilizando AMC. Se produjo un incremento de biomasa en medio TAP3 pero no cuando se utilizó melaza. Al final de la etapa, se produjo  $1.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de biomasa seca en medio TAP3 y  $2.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  cuando se utilizó melaza.

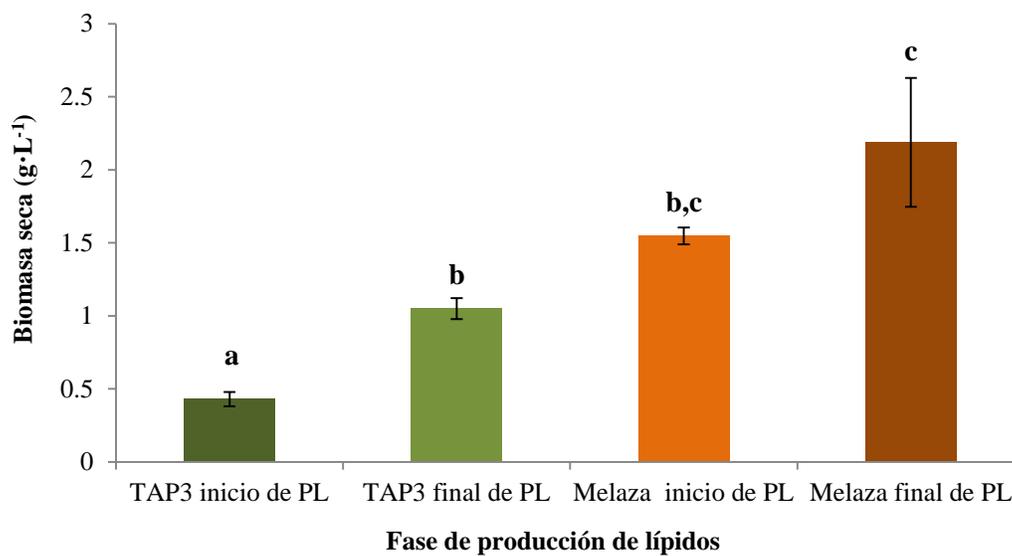


Figura 3. 20. Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$  ).

La mayor cantidad de biomasa producida en melaza se produjo durante la fase de crecimiento de la microalga y no como resultado de continuar el cultivo en la Fase PL. Xu *et al.* [79] reportaron que agregar glucosa e hidrolizado de maíz en polvo como fuente de carbono en el cultivo de la microalga *Chlorella protothecoides*, resultó en una mayor producción de biomasa. Es posible que la melaza haya resultado una buena fuente de nutrientes y que esto haya propiciado una mayor acumulación de biomasa. Mandal *et al.* [31] logró una producción de biomasa seca de  $5.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de la microalga *Scenedesmus obliquus* cuando agrega 1.5% de glucosa en un medio sintético (N11) y establece que no tuvo incremento de lípidos cuando se sometió el cultivo a limitación de nitrógeno.

### 3.7.5.3 Producción de lípidos

El análisis estadístico indicó que la Fase PL no tuvo efecto en la producción de lípidos en los medios estudiados (Figura 3.21). Sin embargo, también se puede observar que el aumento en la producción de lípidos en medio TAP3, durante la Fase PL, fue suficiente para igualar los valores obtenidos con melaza. Los cultivos con AMC presentaron una mayor producción de lípidos que los realizados con melaza.

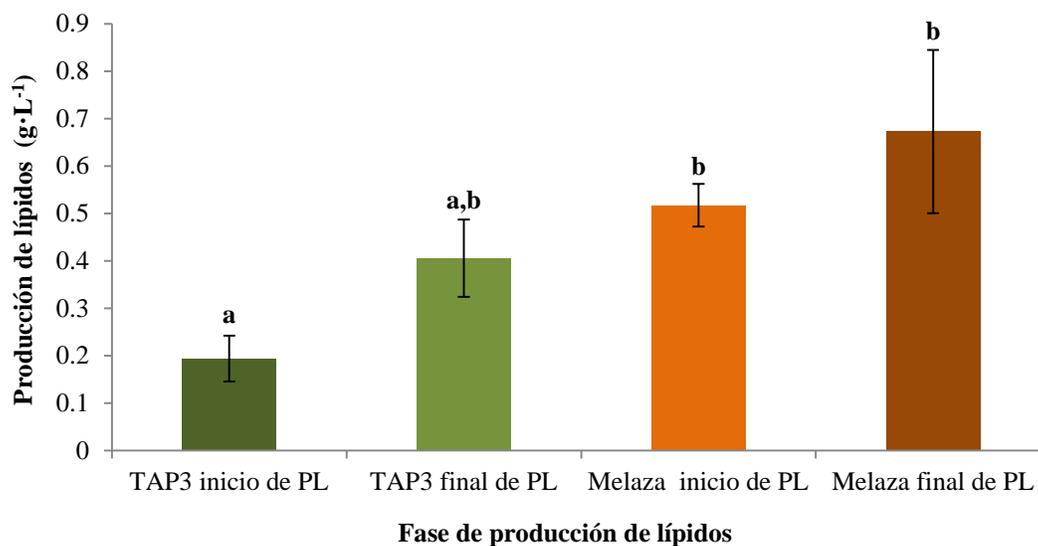


Figura 3.21. Producción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

En la figura 3.22 se presenta el contenido de lípidos en los cultivos de la microalga antes y después de la Fase PL. Se puede observar que no hubo un efecto en el contenido lipídico. Lo que nos indica este resultado, es que la poca biomasa que se generó en medio TAP3, es más rica en lípidos que la producida en el medio con melaza. De igual manera, la biomasa producida con AMC es más rica en lípidos ( $p \leq 0.05$  [ver sección 3.5.5.3]).

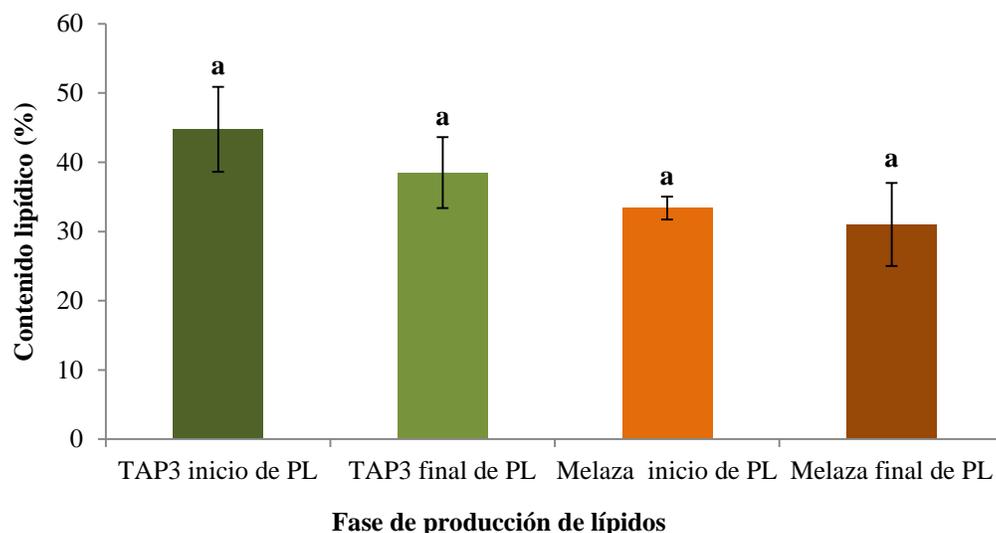


Figura 3.22. Contenido de lípidos (como porcentaje del peso de la biomasa seca) de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en melaza y en medio TAP3 como referencia, durante le fase de producción de lípidos (PL) (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

#### 3.7.5.4 Efecto de la Fase de producción de lípidos en la productividad de biomasa y lípidos de *Scenedesmus* sp. en melaza

En la tabla 3.4 se presentan los valores de la productividad de biomasa seca y lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp. en los cultivos de melaza y TAP3 obtenidos antes y después de la fase de producción de lípidos.

**Tabla 3. 4. Productividad de biomasa seca y de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en melaza y medio TAP3 antes y después de la fase de producción de lípidos (PL).**

Medios	Productividad de biomasa seca ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Productividad de lípidos ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )
TAP3 inicio de PL	$0.045 \pm 0.009$	$0.010 \pm 0.003$
TAP3 final de PL	$0.061 \pm 0.004$	$0.023 \pm 0.005$
Melaza inicio de PL	$0.135 \pm 0.005$	$0.045 \pm 0.004$
Melaza final de PL	$0.051 \pm 0.01$	$0.009 \pm 0.001$

El efecto de la fase de PL tuvo el mismo efecto que el observado cuando se utilizó AMC. Esta fase produjo una mayor productividad tanto de biomasa seca como de lípidos en el medio TAP3, pero tuvo un efecto negativo en el medio con melaza. Sin embargo, son mayores las productividades en el medio con melaza que en el TAP3. Igualmente, la fase de PL no es necesaria cuando se utiliza melaza. Es interesante notar que las productividades (de biomasa seca y de lípidos) son mayores en AMC que en melaza.

### **3.8. Perfil de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

El perfil de los ácidos grasos producidos en un cultivo de microalgas se ve influenciado tanto por el tipo de la fuente de nitrógeno empleada, como por el sometimiento a disminución de este nutriente, tal como reportaron Lin *et al.* [80] en el cultivo de la microalga *Scenedesmus rubescens*.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos cuantificados en los extractos lipídicos de los cultivos realizados con AMC, melaza y medio TAP fueron C14, C16, C18, C18:1 y C18:2. Estos ésteres metílicos ya han sido reportados para el género *Scenedesmus* [80, 81, 82], además de ser los comúnmente encontrados en biodiesel a partir de aceites vegetales. En la Tabla 3.5 se muestra el perfil de FAMEs encontrados en los extractos de los diferentes cultivos antes y después de la fase de producción de lípidos.

**Tabla 3. 5. Tabla 3. 5. Contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en los cultivos de la microalga *Scenedesmus* sp.**

Medios	FAME (%)				
	C14	C16	C18	C18:1	C18:2
TAP2 inicio de PL	19.59 ± 0.73	9.88 ± 2.48	47.44 ± 4.69	nd	23.09 ± 1.48
TAP2 final de PL	9.93 ± 6.02	18.47 ± 4.64	27.31 ± 3.31	2.65 ± 2.34	41.62 ± 6.89
AMC inicio de PL	7.41 ± 6.25	84.48 ± 17.67	3.42 ± 3.58	4.67 ± 0.92	nd
AMC final de PL	3.63 ± 3.63	50.73 ± 11.09	16.79 ± 1.48	28.85 ± 2.45	nd
TAP3 inicio de PL	26.42 ± 7.99	42.65 ± 13.18	7.82 ± 2.72	23.11 ± 8.08	nd
TAP3 final de PL	3.76 ± 0.83	19.79 ± 1.35	68.05 ± 0.33	nd	8.39 ± 0.19
Melaza inicio de PL	nd	11.93 ± 2.06	73.33 ± 3.33	nd	14.74 ± 0.63
Melaza final de PL	22.42 ± 4.99	36.51 ± 5.05	29.82 ± 2.48	11.24 ± 3.11	nd

nd = no detectado

En este trabajo, se observó que tanto el medio de cultivo como la fase PL tuvieron efecto en el tipo de FAMEs producidos. Estos resultados son de utilidad, ya que se podrán utilizar las condiciones de cultivo más aptas para el tipo de biocombustible (derivado de lípidos) que se requiera producir.

En el caso de biodiesel, se desea que la mezcla de FAMEs sea tal (en tipo y cantidad) que produzca un índice de cetano elevado, estabilidad oxidativa y buen flujo en frío [81]. Las dos primeras propiedades son influenciadas por el tamaño de la cadena del éster y que sean saturadas, respectivamente. La tercera propiedad la dan las insaturaciones presentes en las cadenas de los ésteres. Así, el medio TAP fue el que indujo la formación de más ésteres insaturados, pero del tipo C18:2, lo cual puede dar como resultado un biodiesel que se degrade más rápido.

Los resultados indican que en los cultivos realizados en medio TAP2 y TAP3, la fase PL favorece el incremento de los ésteres C18 y C18:2 principalmente. Para los cultivos en AMC y melaza la fase PL provoca un incremento de los ésteres C14, C16 y C18:1. Una peculiaridad es lo sucedido en el medio con melaza, en el cual la fase PL también propicia la disminución del C18, caso contrario a lo sucedido en el medio con AMC en el que se observa un incremento de éste. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, cuando el cultivo es sometido a deficiencia de nitrógeno se induce un incremento principalmente de C16, C18 y C18:1 [74], o de C16 y C18:1 [83].

## CONCLUSIONES

La microalga *Scenedesmus* sp. solamente produjo biomasa y lípidos cuando el agua residual sintética fue adicionada con aguamiel de café o melaza.

Las condiciones que favorecieron una mejor adaptación de *Scenedesmus* sp. fueron 50% (v/v) de aguamiel de café en agua residual sintética con un inóculo del 20% y 2% (v/v) de melaza en agua residual sintética con un inóculo de 5%.

La utilización de aguamiel de café y melaza en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. produjo 3 y 2 veces, respectivamente, más biomasa seca que el medio TAP.

Con la utilización de aguamiel de café (50%) y melaza (2%) en agua residual sintética se obtuvo una mayor producción de lípidos (37.74 y 39.82% respectivamente) que lo obtenido en medio TAP.

Cuando se utilizó aguamiel de café o melaza en agua residual sintética, se llegó al máximo de producción de biomasa y lípidos al final de la fase de crecimiento exponencial, esto ahorra tiempo de proceso, al no ser necesaria una fase posterior de producción de lípidos.

El perfil de ácidos grasos producido por la microalga *Scenedesmus* sp. dependió del tipo de residuo utilizado y del tiempo de cultivo. La microalga produjo preferentemente ácidos grasos saturados del tipo C16 y C18. La adición de nutrientes sin fuente de nitrógeno provocó que en el medio con aguamiel de café aumentara la presencia del ácido graso insaturado C18:1.

## PERSPECTIVAS

Aunque la microalga *Scenedesmus* sp. logró una buena producción de biomasa en los medios con aguamiel de café y melaza, se sugiere utilizar herramientas como el diseño de experimentos y el análisis de superficies de respuesta para optimizarla, igual que la producción de lípidos.

Es necesario realizar estudios más precisos sobre la asimilación por la microalga *Scenedesmus* sp. de los nutrientes presentes en los medios utilizados en este trabajo (nitrógeno, fósforo, carbohidratos, etc) para poder realizar experimentos de limitación de estos nutrientes.

Así como los residuos agroindustriales aguamiel de café y melaza, hay que cambiar el agua residual sintética por agua residual colectada de alguna fuente real (urbana o industrial) para continuar los cultivos de la microalga *Scenedesmus* sp. a escalas mayores que las utilizadas en este trabajo y en condiciones fuera del laboratorio.

Sería interesante cultivar otros géneros de microalgas que han sido reportadas como buenas productoras de lípidos, en los medios utilizados en este trabajo para determinar su efecto en la productividad de lípidos y el perfil de ácidos grasos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Xin; H. Hong; Y. Jia, “Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent” *New Biotechnol.*, 27, 59–63, 2010.
- [2] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae beats bioethanol” *Trends Biotechnol.*, 26, 126–131, 2008.
- [3] A. L. Ahmad; N. H. M. Yasin; C. J. C. Derek; J. K. Lim, Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 15, 584–593, 2011.
- [4] Q. Li; W. Du; D. Liu, Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 749–756, 2008.
- [5] M. M. Loera-quezada; E. J. Olgún, “Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades,” Manejo De Recursos De Ecología, Ed.; A. C. I. K., vol. 1, 91–116.
- [6] J. Jacobo; J. Obando, Techno-economic assessment of biofuel production from microalgae, PhD Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2011.
- [7] S. J. L. Adrián; R. C. B. Medina, *La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán*, Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, 2005.
- [8] Y. Chisti; “Biodiesel From Microalgae” *Biotechnol. Adv.*, 25, 294-306, 2007.
- [9] X. E. Castells, *Energía, Agua, Medioambiente, territorialidad y Sostenibilidad*, Ediciones Díaz de Santos, Madrid, 2012, 1010.
- [10] T. R. Rabiela, *La cosecha del agua en la cuenca de México*, 2nd ed., CIESAS, México, 1998, 124.
- [11] M. R. Hasan; R. Chakrabati, *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture*, FAO Fiat Panis, Roma, 2009, 1-123.
- [12] J. Singh; S. Gu; “Commercialization Potential of Microalgae for Biofuels Production.” *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 2596-2610, 2010.
- [13] A. M. Mathiesen; “FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistic 2012.” *Subdivisión de Estadística y Información del Departamento de Pesca y Agricultura*, 3-73, Roma 2014.
- [14] R. Y. Stanier; J. L. Ingraham; M. L. Wheelis; P. R. Painter, *Microbiología*, Reverte, España, 1996, 768.

- [15] R. U. Knappe, *algae detection and removal strategies for drinking water treatment plants*, American Water Works Association, 32, 466, 2004
- [16] F. R. Trainor; J. R. Cain; L. E. Shubert, Morphology and Nutrition of the Colonial Green Alge *Scenedesmus*: 80 Years Later, 42, 5–25, 2012.
- [17] L. Brennan; P. Owende, "Biofuels From Microalgae-Areview Of Technologies For Production Processing, And Extractions Of Biofuels And Co-Products" *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 557-577, 2010
- [18] J. S. Lee; D. K. Kim; J. P. Lee; S. C. Park; J. H. Koh; H. S. Cho; S. W. Kim, "Effects of SO<sub>2</sub> and NO on growth of *Chlorella* sp. KP-1," *Bioresource Technol.*, 82, 1–4, 2002.
- [19] L. Xin; H. Hong; Y. Jia, "Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent.," *New Biotechnol.*, 27, 59–63, 2010.
- [20] P. M. Schenk; S. R. Thomas; E. Stephens; U. C. Marx; J. H. Mussgnug; C. Posten; O. Kruse; B. Hankamer, "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production," *BioEnergy Res.*, 1, 20–43, 2008.
- [21] R. Huerlimann; R. de Nys; K. Heimann, "Growth, lipid content, productivity and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production.," *Biotechnol. Bioenergy*, 107, 245–57, 2010.
- [22] Y. Li; M. Horsman; B. Wang; N. Wu; C. Q. Lan, "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans.*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 629–636, 2008.
- [23] Clean Cities U.S. Department of Energy; "Clean Cities Alternative Fuel Price Report" *Energy Efficiency and Renewable Energy*. Enero 2015, [http://www.afdc.energy.gov/uploads/publication/alternative\\_fuel\\_price\\_report\\_jan\\_2015.pdf](http://www.afdc.energy.gov/uploads/publication/alternative_fuel_price_report_jan_2015.pdf)
- [24] Q. Lin; N. Gu; J. Lin, "Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga.," *Bioresource Technol.*, 112, 242–247, 2012.
- [25] M. J. Griffiths; T. L. Harrison, "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production," *J. Appl. Phycol.*, 21, 493–507, 2009.
- [26] T. M. Mata; A. Martins; N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 217–232, 2010.

- [27] M. C. Diamiani; C. A. Popovich; D. Constenla A. M. Martínez; E. Doria; P. Longoni; R. Cella; E. Nielsen; P. I. Leonardi, “Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12,” *J Appl Phycol.* 26, 423-430, 2014.
- [28] X. Li; H. Hu; Y. Zhang, Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature, *Bioresour. Technol.*, 102, 3098–102, 2011.
- [29] L. Xin; H. Hong; Y. Jia, “Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent.,” *New Biotechnol.*, 27, 59–63, 2010.
- [30] O. Perez; F. M. Escalante; L. E. de-Bashan; Y. Bashan, “Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products.,” *Water Res.*, 45, 11–36, 2011.
- [31] S. Mandal; N. Mallick, “Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 281–291, 2009.
- [32] G. Huang; F. Chen; D. Wei; X. Zhang; G. Chen, “Biodiesel production by microalgal biotechnology,” *Appl. Energy*, 87, 38–46, 2010.
- [33] M. Takagi; K. Watanabe; K. Yamaberi; T. Yoshida, “Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999.,” *Appl. Microbiol. Biot.*, 54, 112–7, 2000.
- [34] L. Xin; H. Hu; G. Ke; Y. Sun; “Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.,” *Bioresource Technol.*, 101, 5494–500, 2010.
- [35] V. G. Cortes, *Introducción A La Microbiología* 2° edición, EUNED, Costa Rica, 2004, p. 256.
- [36] S. Mandal; N. Mallick, Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 84, 281–91, 2009.
- [37] H. H. Abd El Baky; G. S. El-Baroty; A. Bouaid; M. Martinez; J. Aracil, Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by Optimizing CO<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup> levels for biodiesel production, *Bioresour. Technol*, 119, 429–32, 2012.
- [38] J. M. Peña; F. Martínez; F. E. García; R. O. Cañizares, Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress., *Chemosphere*, 57, 1629–36, 2004.

- [39] H. Vigeolas; F. Duby; E. Kaymak; G. Niessen; P. Motte; F. Franck; C. Remacle, Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*., *J. Biotechnol.*, 162, 3–12, 2012.
- [40] X. Li; H. Hu; Y. Zhang, “Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature.” *Bioresource Technol.*, 102, 3098–102, 2011.
- [41] C. Chacón; C. Andrade; C. Cárdenas; I Araujo; E. Morales, "Uso De *Chlorella* Y *Scenedesmus* En La Remoción De Nitrógeno, Fósforo y DQO De Aguas Residuales Urbanas De Maracaibo , Venezuela." *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38, 94-108, 2004
- [42] J. Park; H. F. Jin; B. R. Lim; K. Y. Park; K. Lee, “Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp.” *Bioresource Technol.*, 101, 8649–57, 2010.
- [43] E. Zhang; B. Wang; Q. Wang; S. Zhang; B. Zhao, “Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment.” *Bioresource Technol.*, 99, 3787–93, 2008.
- [44] M. Salazar, “Aplicacion e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales,” *Bioteconología*, 59, 64-70, 2006.
- [45] J. K. Pittman; A. P. Dean; O. Osundeko, “The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.” *Bioresource Technol.*, 102, 17–25, 2011.
- [46] Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)
- [47] D. Voltolina; B. Cordero; M. Nieves; L. P. Soto; “Growth of *Scenedesmus* sp. in Artificial Wastewater,” *Bioresource Technol.*, 68, 265–268, 1998.
- [48] O. Hammouda; A. Gaber; N. A. Raouf, “Microalgae and Wastewater Treatment.”, *Ecotox. Environ. Safe.*, 31, 205-210, 1995.
- [49] V. J. Nuñez; D. Voltolina; M. Nieves; P. Piña; A. Medina; M. Guerrero, “Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater,” *Bioresource Technol.*, 78, 1999–2002, 2001.
- [50] S. E. Peter; H. Raven; R. F. Evert, *Biology of Plants*, Reverte, New York, 1992, 402.
- [51] D. G. Pichado, “Estud. Sist. Trat. las aguas mieles en Salcedo, Centroam.”, *Café Y Caffé*, 1997.

- [52] M. C. Torres, "Efecto del Estado de Madurez en Mango Minimamente Procesado," *fruit/frutales*, 2004.
- [53] V. Kulandaivelu; R. Bhat, "Changes in the physico-chemical and biological quality attributes of soil following amendment with untreated coffee processing wastewater," *Eur. J. Soil Biol.*, 50, 39–43, 2012.
- [54] M. Selvamurugan; P. Doraisamy; M. Maheswari, "An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process," *Ecol. Eng.*, 36, 1686–1690, 2010.
- [55] C. M. Pérez, "The molasses in the feeding of the bovine livestock," *Avances En Investigación Agropecuaria*, 8, 3-19, 2004.
- [56] F. Ghorbani; H. Younesi; A. E. Sari; G. Najafpour, "Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*," *Renew. Energ.*, 36, 503–509, 2011.
- [57] A. Sanz; K. Montero; R. Díaz, "Utilización De La Vinaza Como Alternativa Para Aliviar El Efecto Destructivo Del Vertimiento De Desecho En La Bahía De Santiago De Cuba," *Tecnología Química*, 25, 32-38, 2005.
- [58] W. Pokora; A. Aksmann; Z. Tukaj, "Functional characteristics of green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae): 276-6 wild type and its two photosystems deficient mutants cultured under photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions," *Phycol. Res.*, 59, 259–268, 2011.
- [59] G. Ahlgren; P. Hyenstrand, "Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus Quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* Sp. (Cyanophyceae)," *J. Phycol.*, 39, 906–917, 2003.
- [60] C. Hung; C. Y. Chang; Q. Liao; X. Zhu; J. S. Chang, "Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents," *Bioresource Technol.*, 145, 331-336, 2013
- [61] T. Roach; A. Sedoud; A. Krleger, "Acetate in mixotrophic growth medium effects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition," *Biochim. Biophys. Acta*, 1827, 1183-1190, 2013.
- [62] R. A. Us, "Efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp.," M.C. Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mexico, 2011.
- [63] L. Alzate; K. González; I. Peraza; O. García; J. Domínguez; J. Vázquez; M. Tzec; B. Canto, "Evaluación del desempeño e identificación de exoelectrógenos en dos tipos

de celdas de combustible microbianas con diferente configuración en el ánodo,” *Interciencia*, 35, 19–25, 2010.

- [64] O. Perez; L. E. De Bashan; J. P. Hernandez; Y. Bashan, “Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella Vulgaris* immobilized with *Azospirillum Brasilense*1,” *J.I Phycol.*, 46, 800–812, 2010.
- [65] Rohm and Hass; “Purification of biodiesel with amberlite BD10DRY”, <http://www.amberlyst.com>.
- [66] Y. C. Sharma; B. Singh; “Advancements in solid acid catalysts for ecofriendly and economically viable synthesis of biodiesel,” *Biofuels Bioprod. Bior.*, 5, 69–92, 2011.
- [67] V. A. Herrera; P. Y. Contreras; S. López; L. F. Barahona, "The green microalgae *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production," *Curr. Microbiol.*, 1-7, 2011.
- [68] L. Miller; “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar,” *Anal. Chem.* 31, 426-428, 1959.
- [69] P. A. Villegas; “Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes Lem*),” M.C. Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC., México, 2011.
- [70] N. Nyholm; T. Kallqvist; “ Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae.,” *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 689–703, 1989.
- [71] L. Guerrero; J. A. Rueda; H. García; A. Karin; “Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in batch culture using Nile Tilapia effluent,” *Bioresource Technol.*, 161, 455–460, 2014.
- [72] Y. Li; Y. F. Chen; P. Chen; M. Min; W. Zhou; B. Martinez; J. Zhu R. Ruan “ Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production,” *Bioresource Technol.*, 102, 5138-5144, 2011.
- [73] T. Cai; S. Y. Park; Y. Li; “Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects,” *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 19, 360-369, 2013.
- [74] M. P. Davi; G. V. Subhash; S. V. Mohan; “Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation.,” *Renew. Energ.*, 43, 276–283, 2012.

- [75] Y. Liang; N. Sarkany; Y. Cui, “Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions.,” *Biotechnol. Lett.*, 31, 1043–1049, 2009.
- [76] E. R. May; “Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. En un fotobiorreactor acoplado a un Sistema de recuperación de biomasa,” M.C. Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC., México, 2015.
- [77] L. Gouveia; A. C. Oliveira, “Microalgae as a raw material for biofuels production ,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269-274, 2009.
- [78] M. J. Griffiths; S. T L. Harrison, “Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production,” *J Appl Phycol.* 21, 493-507, 2009.
- [79] H. Xu; X. Miao; Q. Wu, “High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters.,” *J. Biotechnol.*, 126, 499–507, 2006.
- [80] L. Custódio; F. Soares; H. Pereira; L. Barreira; C. Vizetto-Duarte; M. J. Rodrigues; A. P. Rauter; F. Alberício; J. Varela, “Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries” *J. Appl. Phycol.*, 26, 151-161, 2014.
- [81] Y. Tan; J. Lin, “Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga” *Bioresource Technol.*, 102, 10131–10135, 2011.
- [82] M. Song; H. Pei; W. Hu; S. Zhang; G. Ma; L. Han; Y. Ji “Identification and characterization of a freshwater microalga *Scenedesmus* SDEC-8 for nutrient removal and biodiesel production” *Bioresource Technol.*, 162, 129-135, 2014.
- [83] S. H. Ho; C. Y. Chen; J. S. Chang; “ effect of intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N.,” *Bioresource Technol.*, 113, 244–252, 2012.

## Anexo A

Tabla 1. Componentes del medio TAP [58]

Solución stock (ss)	Volumen	Componente	Conc. en solución stock	Conc. final
Tris base	2.42 g	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$		$2.00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
		Tris(hidroximetil)-aminomethano		
Sales TAP (Sales Beijerinck)	25 mL	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$8.30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$4.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Solución de fosfatos	1 mL	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$28.8 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.65 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$14.4 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
Solución de elementos traza de Hutner	1 mL	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$205.00 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.34 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2.20 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{H}_3\text{BO}_3$	$1.14 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.84 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$4.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0.50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$3.29 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.16 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.23 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0.16 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}$	$0.11 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$9.28 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Acido acético	1 mL	$\text{CH}_3\text{COOH}$	99.5% de pureza	

Tabla 2. Componentes del agua residual sintética (Fórmula de Perez *et al.*) [64]

Reactivos	Cantidad por Litro
NaCl	7 mg
CaCl <sub>2</sub>	4 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.7 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mg
NH <sub>4</sub> Cl	191 mg
Glucosa	10g

Tabla3. Componentes del agua residual sintética (Fórmula de L. Alzate *et al.*) [63]

Reactivos	Cantidad por Litro
Azúcar comestible	4 g
Ácido acético glacial	0.5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 g
NaHCO <sub>3</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g

## Preparación del reactivo de DNS y determinación de azúcares reductores

### Reactivo de DNS

Se requieren los siguientes reactivos en su orden respectivo:

- Tartrato de sodio y potasio  $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Fenol  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Meta bisulfito de sodio  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Hidróxido de sodio  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Disolver los reactivos en 600 mL de agua destilada, al final agregar el DNS poco a poco hasta lograr una completa disolución, aforar a un litro.

Para determinar los azúcares reductores se añaden 1.5 mL de la solución DNS a 0.5 mL de la solución problema, se agita y se coloca en un baño María a punto de ebullición durante 15 minutos, se enfría a temperatura ambiente y se agregan 8 mL de agua destilada, se agita y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. El análisis se realiza por triplicado. La cantidad de azúcares reductores se obtiene al comparar el promedio de las lecturas de absorbancia obtenidas con una curva de calibración. Curva de calibración de glucosa: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de glucosa en un rango de concentración de 0.1 a 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En este trabajo la concentración de azúcares reductores se calculó según la fórmula:

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = ((1.8346)(\text{absorbancia}) + 0.0358)(\text{factor de dilución})$$