

# **PROYECTO FIN DE MÁSTER**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA**



## **TRATAMIENTO DE PURINES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL**

**Olga Cervera del Castillo**

**Almería, 23 de Septiembre de 2011**



**DIRECTOR: Ignacio Flores Sánchez**


FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA



TRATAMIENTO DE PURINES PARA LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA MICROALGAL



ALUMNA:  
Olga Cervera del Castillo

  
Fdo:.....

Vº Bº DIRECTOR:  
Ignacio Flores Sánchez

  
Fdo:.....

# ÍNDICE

<b>1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1. EVOLUCIÓN EN EL ESTUDIO Y USO DE LAS MICROALGAS	3
2.2. PROBLEMÁTICA Y POSIBLE SOLUCIÓN DEL RESIDUAL PORCINO	4
2.3. CULTIVO DE MICROALGAS EN LABORATORIO	5
2.3.1. <i>MEDIOS DE CULTIVO</i>	6
2.3.2. <i>SISTEMAS DE PRODUCCIÓN</i>	6
2.3.3. <i>PARÁMETROS DE CULTIVO</i>	7
2.3.4. <i>CINÉTICA DE CRECIMIENTO</i>	8
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
3.2. MÉTODOS GENERALES SIN RESIDUAL	11
3.2.1. <i>MICROALGAS SELECCIONADAS</i>	11
3.2.2. <i>MEDIO DE CULTIVO</i>	12
3.2.3. <i>CONSERVACIÓN DE CEPAS</i>	13
3.2.4. <i>SISTEMA Y CONDICIONES DE CULTIVO</i>	14
3.3. MÉTODOS GENERALES CON RESIDUAL	15
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	16
3.4.1. <i>EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR</i>	16
3.4.2. <i>ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL RESIDUAL</i>	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>18</b>
4.1. CEPAS SELECCIONADAS	18
4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	19
4.3. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROALGAL	20
4.4. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>CHLORELLA</i> SP. EN PURINES	25
4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PURINES	25
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>

## 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Uno de los productos alimenticios más consumidos por la sociedad española es la carne de cerdo y todos sus derivados, aprovechándose prácticamente todo a excepción de los purines o excrementos porcinos. El exceso de concentración porcina en diferentes puntos del país está provocando un gran problema medioambiental y de difícil solución, por este residuo.

La problemática de los purines se acentuó al contar con explotaciones cada vez más grandes y con cada vez menor terreno donde aplicar el residuo como fertilizante, y como consecuencia de ello, los purines pueden llegar a las masas de agua contaminándolas por eutrofización, provocar la nitrificación en los suelos y producir gases responsables de malos olores y que pueden llegar a ser peligrosos. Considerando que el purín es cien veces más contaminante que las aguas residuales urbanas, se hizo presente la preocupación por la correcta gestión de estos residuos, así como la búsqueda de nuevas alternativas para su reutilización y valorización.

Uno de los objetivos de Phycoelementa, es la aplicación de microalgas en el tratamiento de purines, utilizando y transformando los nutrientes de este residuo para producir biomasa microalgal, fuente de diferentes productos de suma utilidad, además de conseguir una disminución de la emisión de metano durante el almacenamiento de los purines, un gas altamente contaminante y de mayor efecto invernadero que el CO<sub>2</sub>.

El estudio de la composición de este residual se basa en el análisis de los elementos de mayor interés para el cultivo de microalgas, concretamente las pertenecientes al género *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*, comparándolo con un medio de cultivo estándar empleado para su cultivo en condiciones de laboratorio.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. EVOLUCIÓN EN EL ESTUDIO Y USO DE LAS MICROALGAS

Desde el punto de vista biotecnológico, el uso de las microalgas, no surge hasta los años cuarenta en Alemania, pero no es hasta los años setenta, cuando realmente se producen grandes avances en este campo. Comienzan a comercializarse productos que contienen como principal ingrediente microalgas, destinados a la nutrición humana y se inician estudios sobre la utilización de estos microorganismos en el tratamiento de aguas residuales. En la actualidad, se han encontrado una amplia variedad de especies de microalgas con las que se pueden obtener muchos productos orgánicos esenciales para la nutrición humana, tales como proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, pigmentos, vitaminas, alcaloides, antibióticos, etc., (Abalde *et al.*, 1995).

Por definición y desde el punto de vista biotecnológico, las microalgas son microorganismos unicelulares que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos similares capaces de realizar la fotosíntesis. Las cianobacterias o algas verde-azuladas, son células procariotas consideradas microalgas, quedando excluidas aquellas células procariotas, que aún realizando la fotosíntesis, no contienen clorofila *a* sino bacterioclorofila y además no realizan una fotosíntesis oxigénica como las microalgas, sino anoxygenica (Staley *et al.*, 1989).

Las microalgas son organismos unicelulares de tamaño y forma muy variada, estando presentes en todos los ecosistemas conocidos, pero con mayor importancia en los ecosistemas acuáticos. Se estima que el 90% de la fotosíntesis de la Tierra es realizada por microalgas acuáticas, contando en la actualidad con más de 30000 especies diferentes, de las cuales sólo 50 han sido estudiadas con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico.

El estudio científico de las microalgas comienza en 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece los primeros cultivos puros de una microalga de agua dulce

denominada *Chlorella vulgaris*. En 1919 Otto Warburg, consiguió cultivos densos de *Chlorella sp.*, con el fin de estudiar el proceso de la fotosíntesis.

El primer estudio recogido en bibliografía, data de 1942 durante la II Guerra Mundial en Alemania, con el objetivo de producir biocombustible, mediante la producción industrial de lípidos a partir de las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* (Harder y Von Witsch, 1942). En los años setenta se inició la comercialización de productos dietéticos de *Chlorella sp.*, en Japón y Taiwan, iniciándose además en esta época estudios relacionados con el tratamiento de aguas residuales mediante eutrofización controlada con microalgas, presentando propiedades nutricionales adecuadas como alimento para el ganado (Langdom y Waldock, 1981).

## **2.2. PROBLEMÁTICA Y POSIBLE SOLUCIÓN DEL RESIDUAL PORCINO**

El tratamiento y eliminación de residual porcino es uno de los problemas ambientales más importantes que se deben resolver en muchos países. En España hay aproximadamente 25 millones de cerdos concentrados en áreas muy pequeñas, con sistemas de tratamiento y eliminación inadecuados. Las regiones españolas con altos porcentajes de explotaciones porcinas son: Valencia, Aragón, Castilla-León y Andalucía.

Dentro de la región de Andalucía, en la provincia de Sevilla, hay aproximadamente 600000 cabezas de cerdos que producen un volumen de purines de 1,1 millones de toneladas al año (Boletín Mensual de Estadística, 2009).

Debido a los bajos costes de construcción y operación, uno de los sistemas de tratamiento más usados y extendidos es la estabilización de los purines en estanques al aire libre, (el material no es aireado y los requerimientos de oxígeno se obtienen a través de la superficie natural de aireación). Las bacterias consumen el oxígeno producido por las microalgas, descomponiendo la materia orgánica y produciendo dióxido de carbono, amonio

y fosfato, que son asimilados por las microalgas (Oswald, 1955; Palmer, 1977; Ramalho, 1983; Hamer, 1985; Lavoie and de la Noüe, 1985; Finlayson *et al.*, 1987; Lembi and Waaland, 1988).

El cultivo de microalgas en estanques abiertos al aire libre, constituye una valiosa fuente de proteínas, vitaminas y otros compuestos, dándole una gran variedad de utilidades.

Además se pueden obtener al mismo tiempo que se disminuye la contaminación de las aguas residuales (Richmond, 1986, 1988; Belcher and Swale, 1988; Borowitzka and Borowitzka, 1988; Lembi and Waaland, 1988; De la Noüe and Prouix, 1988).

De las especies de microalgas más comunmente aisladas en tanques de estabilización de purines, son las pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus sp.* Los purines se caracterizan por contener una elevada concentración de compuestos orgánicos, un buen balance de carbono y nutrientes, que puede cumplir con las necesidades para el cultivo de microalgas (Travieso, 1979; Travieso and Benítez, 1982).

## **2.3. CULTIVO DE MICROALGAS EN LABORATORIO**

Un cultivo de microalgas en laboratorio puede ser definido como un medio ambiente artificial, en el cual las microalgas crecen y se desarrollan a partir de las condiciones predeterminadas por el cultivador. En teoría las condiciones de cultivo deben ser tan semejantes como sea posible al ambiente natural en que crece el alga; en realidad existen muchas diferencias, la mayoría de las cuales son deliberadamente impuestas (Probert y Klass, 1999).

### **2.3.1. MEDIOS DE CULTIVO**

En el proceso de selección de medios de cultivo, la asimilación de nitrógeno reviste una importancia básica para el desarrollo de los cultivos de microalgas, la fuente y concentración de nitrógeno determinan en gran medida los cambios en el crecimiento y

composición bioquímica de una especie microalgal, influyendo fundamentalmente sobre el contenido proteico, la fracción lipídica y la síntesis de clorofila. Un factor importante en la preparación de un medio de cultivo para microalgas es la forma en la cual el nitrógeno es suministrado. Las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas para el cultivo de *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*, son: amonio, nitrato y urea. El nitrato y la urea son reducidos a amonio por el microalga antes de incorporarlo a los compuestos orgánicos (Maldonado, 1987).

### **2.3.2. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN**

El cultivo de microalgas en medio líquido se considera un proceso, por el cual el volumen de concentración de una población dada se incrementa. El mismo requiere de un inóculo viable, la adición de nutrientes, microelementos necesarios, y condiciones físico-químicas apropiadas (Probert y Klass 1999):

Los sistemas de cultivo de microalgas comprende cultivos estáticos (Batch), semicontinuos y continuos (Vonshak, 1988). El más utilizado en los laboratorios es el sistema de cultivo estático escalonado, que consiste en iniciar el cultivo con pequeños volúmenes, como tubos de ensayo o matraces, pasando desde garrafrones a columnas, hasta tinas o pilas.

Un factor importante es el diseño de los recipientes, que tienen diferentes formas (redondas, ovaladas, cuadradas, rectangulares, cilíndricas) y profundidades desde 60 cm hasta 2 metros. Esta última característica es esencial para el crecimiento de las microalgas, debido a que una baja profundidad permite una buena penetración de la luz, lo cual trae como consecuencia un rápido aumento de la concentración celular y cosechas finales más altas (Richmond, 1986; Oswald, 1988).

Las cepas de microalgas se mantienen bajo condiciones controladas, generalmente con iluminación constante y temperatura controlada con acondicionadores de aire. Para los



volúmenes mayores se usan matraces, garrafones y cilindros cónicos o de fondo plano transparentes, de 20 a 400 litros. Los cultivos de 200 a 400 litros y los masivos son generalmente llevados a cabo al exterior y más raramente al interior (López-Elías *et al.*, 2003a).

### 2.3.3. PARÁMETROS DE CULTIVO

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son, cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura (Barsanti *et al.*, 2006).

#### Nutrientes:

**Tabla 2.1.** Requerimientos nutricionales principales para el cultivo de microalgas.

Requerimientos	Compuestos Químicos	Valores
<b>C</b>	CO <sub>2</sub> , CO <sub>3</sub>	g/100 ml
<b>O, H</b>	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	g/100 ml
<b>N</b>	N <sub>2</sub> , NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub>	g/100 ml
<b>P</b>	PO <sub>4</sub>	g/100 ml
<b>S</b>	SO <sub>4</sub>	g/100 ml
<b>Na, K, Ca, Mg</b>	Sales	g/100 ml
<b>Fe, Zn, Mn, B, Br, Si</b>	Sales	mg/100 ml
<b>Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al,</b>	Sales	µg/100 ml
<b>Vitaminas</b>	B <sub>12</sub> , Tiamina y Biotina	µg/100 ml

**Temperatura:** La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies.

**pH:** El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo.

**Aireación:** La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire.

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

#### **2.3.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO**

La cinética de crecimiento de las microalgas es similar a la observada en otros microorganismos, la diferencia reside en que la fuente de energía es instantánea e independiente del medio de cultivo (Palmer, 1977; Lavoie and de la Noüe, 1985; Lembi and Waaland, 1988; Richmond, 1988; Ogbondeminu and Okoye, 1992; Vonshak, 1993; Kayombo *et al.*, 2003).

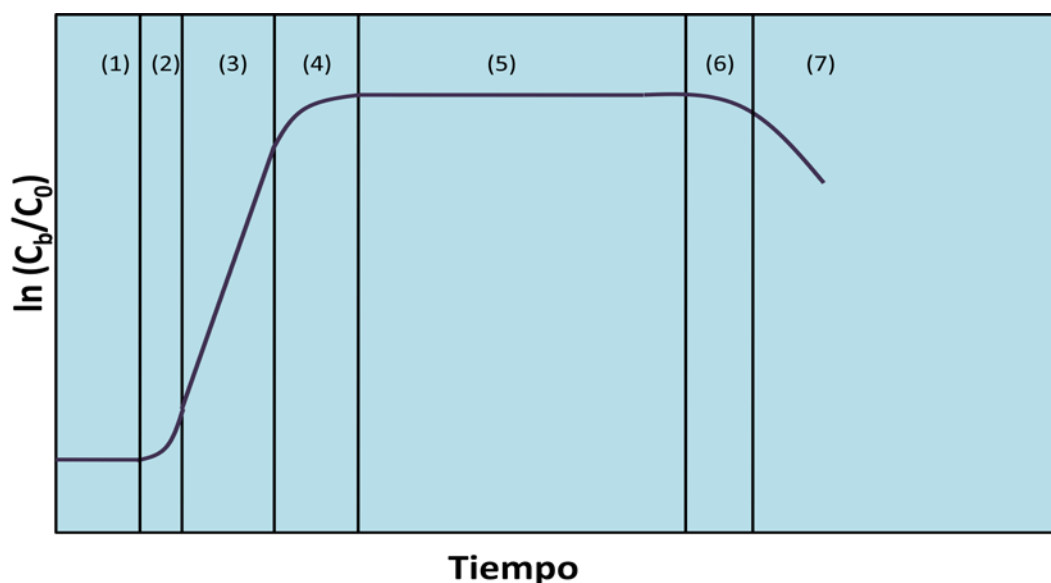
Las microalgas verde-azuladas, concretamente *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*, en una proporción del 10% con su medio de cultivo, aisladas en tubos cerrados con aire conteniendo un 2% de dióxido de carbono y expuestas a radiación y temperatura constante, en cultivo discontinuo; generalmente en su proceso de desarrollo muestran una pequeña fase de latencia, seguida de una rápida fase de crecimiento exponencial. La fase de latencia alcanzada por el cultivo suele ser pequeña, seguida de una rápida fase de crecimiento exponencial la cual suele durar tres días, llegando a la fase de crecimiento estacionario al cuarto día, prolongándose hasta el sexto día a partir del cual el cultivo comienza la fase de declinación.

En la Figura 2.1 se muestra la curva de crecimiento tipo de *Chlorella* y *Scenedesmus* sp, compuesta por cinco etapas fundamentales, aunque en literaturas actuales se refieren siete fases: incluyendo entre la fase de latencia y la exponencial una fase de aceleración y entre la fase exponencial y estacionaria una fase de desaceleración.

Se han desarrollado diferentes modelos cinéticos para el cultivo de microalgas en sistemas estáticos (Martínez et al, 1999) estudiando el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* usando el modelo de Monod en un medio mineral con concentraciones de fósforo de hasta 372  $\mu\text{M}$  y temperatura entre 20 – 35°C.

La inhibición constante debido a la presencia de fósforo, incrementó cuando la temperatura paso de 20 a 30 °C y disminuyó cuando la temperatura estaba por encima de los 30 °C. La velocidad específica de crecimiento máxima fue de 0,047  $\text{h}^{-1}$  a 30 °C, mientras que el mayor rendimiento se registró a los 20 °C. Zhang *et al.* (1999) usó un modelo de inhibición para describir el crecimiento heterotrófico de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en cultivo estático.

**Figura 2.1.** Curva de crecimiento tipo, (1) fase de latencia, (2) fase de aceleración, (3) fase exponencial, (4) fase de desaceleración, (5) fase estacionaria, (6) fase de declinación y (7) fase de muerte

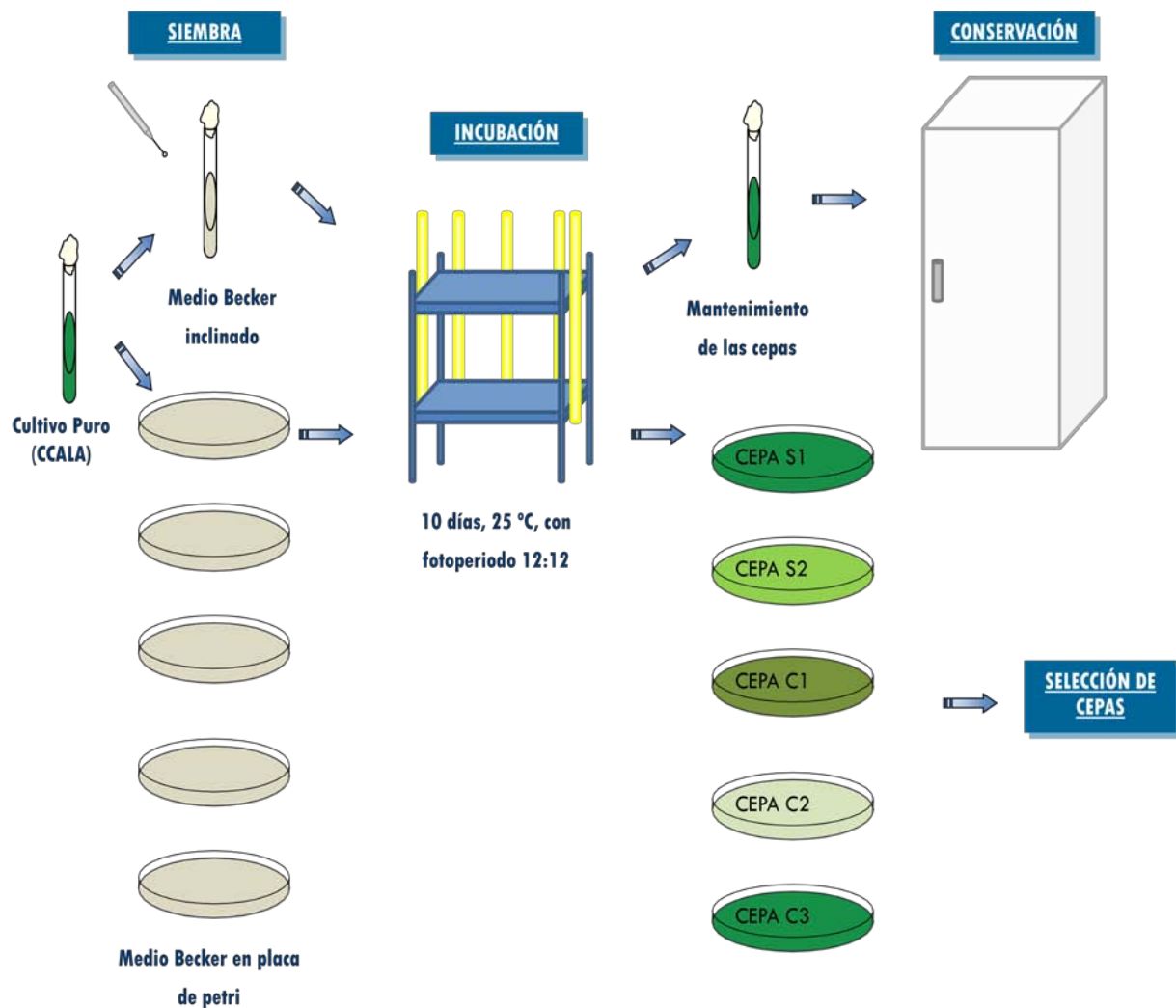


### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo, se proporcionaron inicialmente tres cepas de *Chlorella sp.*, y dos de *Scenedesmus sp.*, que tras el periodo de incubación necesario de las mismas en un medio de cultivo estándar según Becker, 1995, agarizado al 2%, se seleccionó una cepa de cada género, siguiendo el tratamiento mostrado en la Figura 3.1.

**Figura 3.1.** Diseño experimental para conservación y selección de cepas



Con las dos cepas seleccionadas, se realizaron cultivos unialgales escalonados en el laboratorio de Phycoelementa, hasta la fase exponencial, bajo ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas, suministro continuo de aire con un compresor y a temperatura ambiente ( $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Para el seguimiento del cultivo se utilizó la absorbancia del mismo como parámetro, al inicio del último escalonado, con ayuda de un espectrofotómetro, en cada una de las tres repeticiones hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento, obteniendo 5 ml diarios de cultivo para tal fin.

Llegado a este punto, se llevó a cabo una evaluación del crecimiento celular de las dos cepas, y se comenzó a cultivar la cepa seleccionada de *Chlorella sp.*, con residual porcino como medio nutritivo, incorporando periódicamente purines y observando la morfología celular de la cepa en un microscopio óptico. Finalmente se realizó una comparativa de la composición nutricional del medio de cultivo estándar empleado en el escalonado con la de los purines.

## **3.2. MÉTODOS GENERALES SIN RESIDUAL**

### **3.2.1. MICROALGAS SELECCIONADAS**

En el presente trabajo se utilizaron microalgas verde-azuladas de agua dulce pertenecientes al género *Scenedesmus* y *Chlorella sp.*, proporcionadas por la colección de microalgas del Instituto botánico de la Academia de Ciencias de la República Checa, CCALA (Culture Collection of Autotrophic Organisms).

Inicialmente se comenzó a trabajar con tres cepas de *Chlorella sp.*, y dos de *Scenedesmus sp.*, seleccionando una cepa de cada género para el escalonado, siendo el criterio de selección, la rapidez de crecimiento de las mismas en placas de petri, empleando medio de cultivo estándar agarizado al 2 % según Becker, 1995, y previamente autoclavado a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$

durante 20 minutos. Las placas se observaron tras un periodo de incubación de 10 días, bajo ciclos de luz:oscuridad con luz artificial de 12:12 horas y temperatura ambiente.

### 3.2.2. MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación del medio de cultivo se empleo agua destilada, cuando se requería medio de cultivo agarizado al 2% para tubos de ensayo y placas de petri, y agua embotellada para el cultivo y escalonado de las cepas en medio de cultivo líquido. La adición de nutrientes se ha basado en un medio de cultivo estándar para *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*, propuesto por Becker, 1995, dividiéndolos en macro y micronutrientes. La disolución concentrada de macronutrientes no es posible prepararla, por problemas de precipitación, por lo que estos deben ser preparados cada vez que se necesiten. Los micronutrientes se preparan por pesada directa, disolviéndolos en agua destilada o embotellada en función de su utilización, hasta una concentración 10X, la composición exacta del medio de cultivo empleado se detalla en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.-** Medio de cultivo estándar para *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*,(Becker, 1995)

Componente	Concentración (g·L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>	
KNO <sub>3</sub>	0.810
NaNO <sub>3</sub>	0.680
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.415
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.250
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.180
<b>Micronutrientes</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.025
FeEDTA	0.004
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0025
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0002
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.00003

Se han seguido dos métodos de preparación en función del fin último del medio. En el caso de los tubos de ensayo y placas de petri para el mantenimiento de las cepas, se adiciona la cantidad conveniente de macronutrientes, tras pesada directa, en la mitad de volumen necesario de agua destilada y en condiciones de agitación constante, una vez disueltos, se añade el volumen necesario de la disolución concentrada 10X de micronutrientes, preparada en agua destilada y un 2 % de agar bacteriológico, finalmente se esteriliza en autoclave a 121 °C y 2 atm durante 20 minutos. Para el medio de cultivo líquido, igualmente se adicionan los macronutrientes en las cantidades necesarias, en la mitad de volumen de agua embotellada, una vez disueltos, se añade el volumen conveniente de la disolución concentrada de micronutrientes en agua embotellada y ya se puede adicionar a los recipientes de cultivo sin necesidad de autoclavar.

### ***3.2.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS***

Para el mantenimiento de las cinco cepas proporcionadas, se realizaron resiembras cada 60 días en tubos con medio de cultivo estándar agarizado al 2% e inclinado, siendo fundamental su previa esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Pasado un tiempo de incubación de 10 días a temperatura ambiente y fotoperiodo 12:12 horas con luz artificial, se conservaron en frigorífico a 4°C, bajo condiciones de iluminación artificial continua proporcionada por dos bombillas de 11 W.

Con respecto a las cepas seleccionadas, constituyendo la colección del presente trabajo, además de su mantenimiento en tubos inclinados, también se llevará a cabo su mantenimiento en medio estándar líquido. Para los cultivos de reserva se utilizan matraces Erlenmeyer de 250 ml, tapados con algodón, sin agitación ni aireación, y mantenidos bajo iluminación artificial continua y a una temperatura de 4 °C, junto con los tubos inclinados.

### 3.2.4. SISTEMA Y CONDICIONES DE CULTIVO

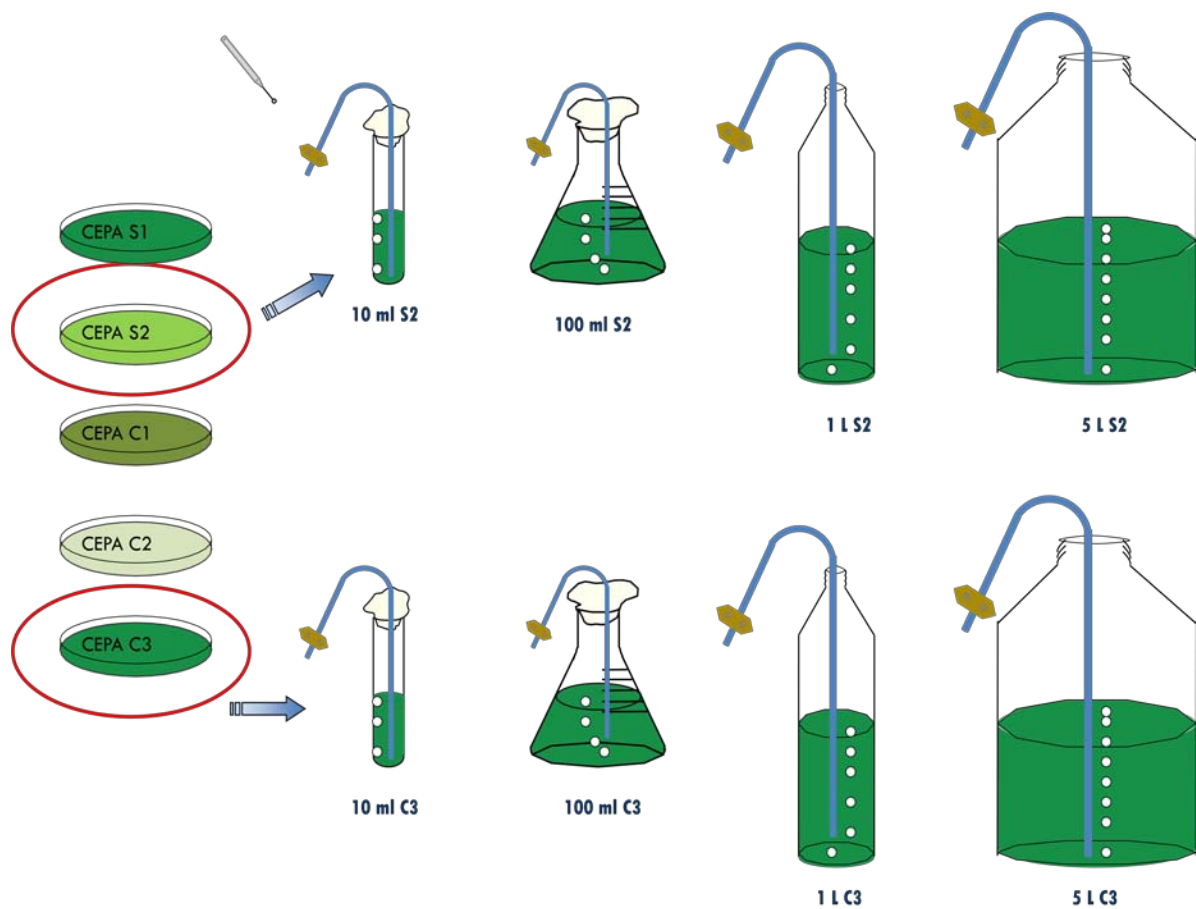
El método de cultivo más utilizado a escala de laboratorio para realizar estudios, evaluaciones de cepas y propagación de inóculos es el cultivo discontinuo o estático, el que también es empleado para cultivos a cielo abierto a gran escala y fue el método desarrollado para esta investigación con las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus sp.*

Las experiencias partieron con la inoculación de la cepa en 10 ml de medio de cultivo líquido en un tubo de ensayo, con ayuda de un asa de platino y en condiciones de esterilidad, con el objetivo de no contaminar la placa de petri o tubo que contiene el cultivo puro de partida. Una vez alcanzada la concentración de biomasa microalgal deseada (0,2 g/L en aproximadamente 10 días), se transfiere el cultivo a volúmenes mayores.

Por cada especie seleccionada, todos los cultivos y escalonados se realizaron por triplicado, es decir, tres tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo que pasado un tiempo de 10 días, se pasaron a tres matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 90 ml de medio de cultivo fresco, estos a tres botellas de plástico de dos litros de capacidad con 900 ml de medio y finalmente a tres garrafas de ocho litros de capacidad con cuatro litros de medio fresco, estando todos los recipientes cerrados con algodón o tapón de plástico, tal y como se muestra en la Figura 3.2.

La experimentación se llevo a cabo en el cepario de Phycoelementa, proporcionando las condiciones más adecuadas para el establecimiento de los cultivos. Para ello se les colocó una bomba de aire, conteniendo un 2% de CO<sub>2</sub>, para evitar la sedimentación de las microalgas, permitir la homogenización de los nutrientes y facilitar su fotosíntesis. Además se sometieron a ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas con luz artificial, proporcionada por 6 tubos fluorescentes Sylvania Luxline Plus F58W/865 Daylight de Luxe, a temperatura ambiente (30 °C ± 4 °C).



**Figura 3.2.** Diagrama de flujo del escalonado de los cultivos en el Cepario de Phycoelementa

### 3.3. MÉTODOS GENERALES CON RESIDUAL

De las dos cepas utilizadas en los cultivos escalonados, la experimentación con purines se realizó con la perteneciente al género *Chlorella sp.*, una vez alcanzada la fase exponencial, previamente a la finalización de la evaluación de su crecimiento en el medio de cultivo estándar según Becker, 1995.

Se homogeneizaron nueve litros de cultivo y se repartieron en tres garrafas de plástico de ocho litros de capacidad, adicionándoles a cada uno de ellos purines de cerdo previamente filtrados con algodón y gasas.

El ensayo se llevó a cabo durante 14 días, en los cuales se controlaron diariamente pH y temperatura, manteniendo los mismos parámetros que en el cultivo escalonado con medio

estándar, y agitando las garrafas de forma manual. Los volúmenes de purines adicionados y el tiempo de incubación en cada caso se muestran en la Tabla 3.2., terminando el ensayo cuando el volumen final era el doble del volumen inicial de cultivo en cada uno de los recipientes.

**Tabla 3.2.** Volúmenes adicionados y tiempo de incubación en el ensayo con purines

Volúmenes de purines (ml)	Tiempos de Incubación (días)
200	3
800	5
1600	6

Se realizó un seguimiento diario del estado del cultivo mediante la observación al microscopio óptico de campo claro Olympus BX40.

### 3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.4.1. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Para seguir el crecimiento celular de ambas cepas cultivadas, se utilizó como parámetro la absorbancia del cultivo, empleando para ello un espectrofotómetro T60 UV-Visible, a una longitud de onda de 750 nm para evitar la interferencia de los pigmentos (Melinda, 2011).

La elección del procedimiento se ha basado en la rapidez de la medida y la carencia de error con respecto a otros métodos utilizados, como el conteo celular (Butterwick y col., 1982). Para conocer la relación existente entre la absorbancia y el peso seco tanto para *Chlorella sp.*, como para *Scenedesmus sp.*, se realizaron determinaciones periódicas de ambos parámetros. Para ello un volumen conocido de cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m., durante 30 minutos, siendo desechado el sobrenadante mientras que la biomasa es secada a 65 °C durante 24 horas y finalmente pesada.

La cuantificación de la biomasa se efectuó por la técnica de densidad óptica, expuesta anteriormente, por triplicado y analizada cada 24 horas. La velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $\text{d}^{-1}$ ) se calculó tomando la pendiente de la recta que resulta al graficar  $\text{Ln}(X/X_0)$  vs el tiempo, donde  $X$  es la concentración de biomasa y  $X_0$  es la concentración del inóculo en g/L. El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) se determinó con la ecuación  $T_d = (\text{Ln}2/\mu_{\text{máx}})$  días<sup>-1</sup> (Bailey y Ollis, 1986) y la productividad fue calculada como productividad máxima de acuerdo a la ecuación  $P_b = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , donde  $X_0$  corresponde a la concentración de biomasa inicial (g/L) a tiempo  $t_0$ , y  $X_t$  la concentración de biomasa (g/L) cuando esta es máxima a lo largo del tiempo de ensayo (Schmidell et al., 2001).

### **3.4.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL RESIDUAL**

Con el objetivo de realizar una comparativa de la composición nutritiva de los purines, con respecto al medio de cultivo estándar empleado, el residual se caracterizó mediante la determinación del nitrógeno(N) y fósforo (P) totales, potasio (K), demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>); parámetros indispensables para el desarrollo del cultivo de la microalga *Chlorella sp.*

Los análisis químicos se ejecutaron mediante:

- Nitrógeno total: método Kjeldahl (AOAC, 1984); método estándar, Andrew (1995).
- Fósforo total: colorimetría con cloruro estagnoso; método estándar, Andrew (1995)
- Potasio: fotometría de llama; Herrera (1980)
- DQO: método de microdeterminación; Bartos y Conde (1978)
- DBO<sub>5</sub>: método de microdeterminación; Bartos (1978)

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

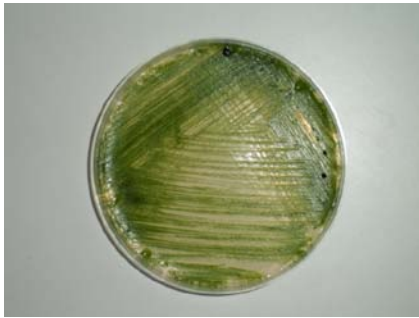
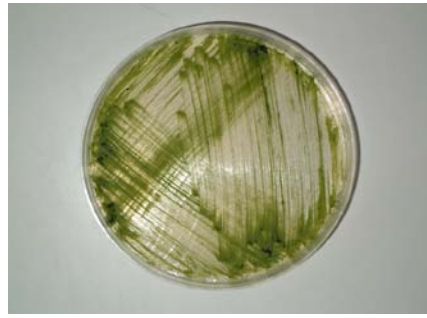
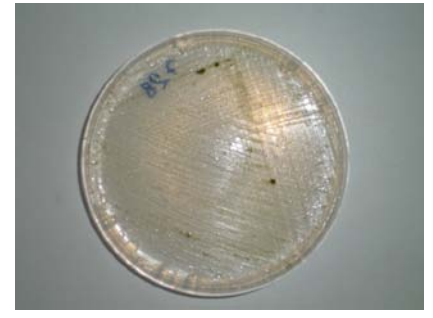
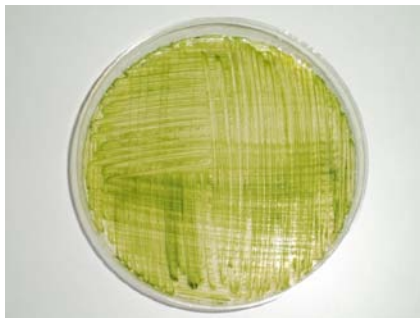
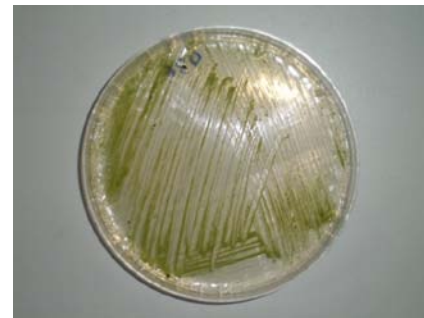
### 4.1. CEPAS SELECCIONADAS

A partir de la colección de microalgas de la que dispone el cepario de Phycoelementa, se seleccionaron aquellas pertenecientes al género *Chlorella* y *Scenedesmus sp.* Estas microalgas son comúnmente utilizadas en el tratamiento de residuales provenientes de plantas de tratamientos convencionales (Lavoie, 1985; Tam, 1990), aguas residuales industriales (González, 1997; Romero, 2000) y residuos animales (Travieso, 1982; Rosales, 2007), Así como en la producción masiva de biomasa para fines comerciales (Voltolina, 2004; Chacón, 2004). Además estas microalgas presentan una elevada capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en diferentes tipos de aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales (González, 2006).

Tras un periodo de incubación de 10 días, se observó el crecimiento de las distintas cepas, seleccionando aquellas que presentaron mayor rapidez de crecimiento en el medio de cultivo elegido, bajo las condiciones de temperatura e iluminación impuestas.

Como se observa en la Figura 4.1, de las tres cepas pertenecientes al género *Chlorella sp.*, la que presenta mayor rapidez de crecimiento es la número 788 con respecto a la cepa 266 que presenta un crecimiento medio, y la cepa 728 que apenas presenta crecimiento. De las pertenecientes al género *Scenedesmus sp.*, la cepa 784 presenta un buen crecimiento con respecto a la número 436 que presenta un crecimiento más leve.

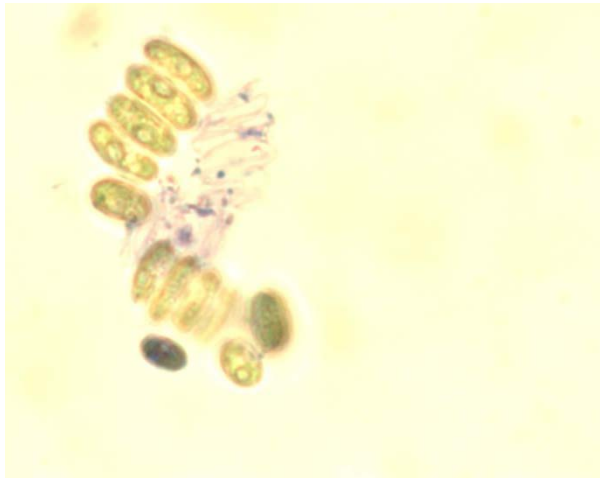
Después de la observación, todas las placas fueron fotografiadas y guardadas en frigorífico con luz continua artificial.

**Figura 4.1.** Crecimiento de las cepas en placa de petri para selección**CEPAS DE *CHLORELLA*****CEPA 788****CEPA 266****CEPA 728****CEPAS DE *SCENEDESMUS*****CEPA 784****CEPA 436****4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS**

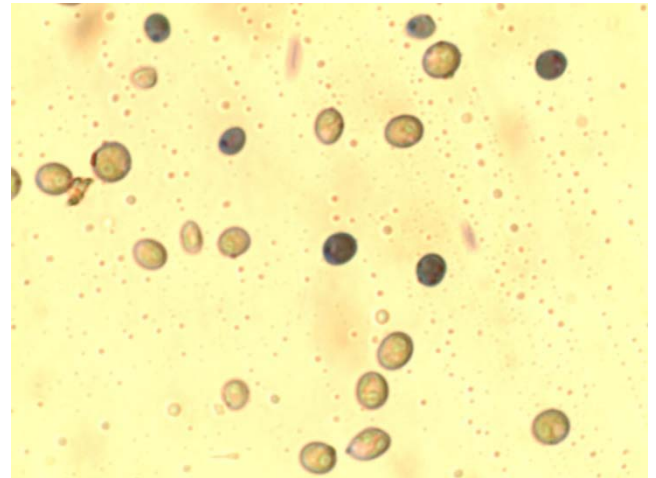
Una vez alcanzado el último escalonado, ambas cepas se observaron al microscopio óptico, con el objetivo de confirmar que tanto la cepa 788 pertenece al género *Chlorella sp.*, como la número 784 al género *Scenedesmus sp.*, observando sus características morfológicas y contrastándolas con un libro de claves adecuado.

La Figura 4.2 corresponde a la cepa 784, observándose colonias formadas por grupos de 4 a 8 células, con una organización lineal o en zigzag, cuerpo celular alargado en forma de huso con pared celular lisa, presentando las células externas una curvatura hacia dentro.

**Figura 4.2.** Vista al microscopio óptico de la cepa 784



**Figura 4.3.** Vista al microscopio óptico de la cepa 788



La cepa 788 es una microalga unicelular inmóvil al igual que la cepa 784, sin constricción en la parte media de la célula, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto en forma de copa, tal y como se muestra en la Figura 4.3. Las colonias de *Chlorella sp.*, a veces están rodeadas de mucílago y la modalidad de la agregación de la célula es característica de las especies lo que facilita su identificación.

#### 4.3. DETERMINACIÓN DEL CREMIENTO MICROALGAL

Paralelamente a los registros de densidad óptica de los dos cultivos de microalgas se realizó el peso seco de un volumen conocido de los cultivos por triplicado en los días 0, 5 y 10 lo que permitió obtener ecuaciones de regresión para cada cepa así como el valor de  $R^2$  (Tabla 4.1). Esto permitió realizar una extrapolación de los valores de densidad óptica y concentración de biomasa para cada cepa.

**Tabla 4.1.** Ecuaciones de regresión y coeficiente de determinación para cada cepa, obtenidas con los valores de densidad óptica a 750 nm y peso seco los días de cultivo 0, 5 y 10.

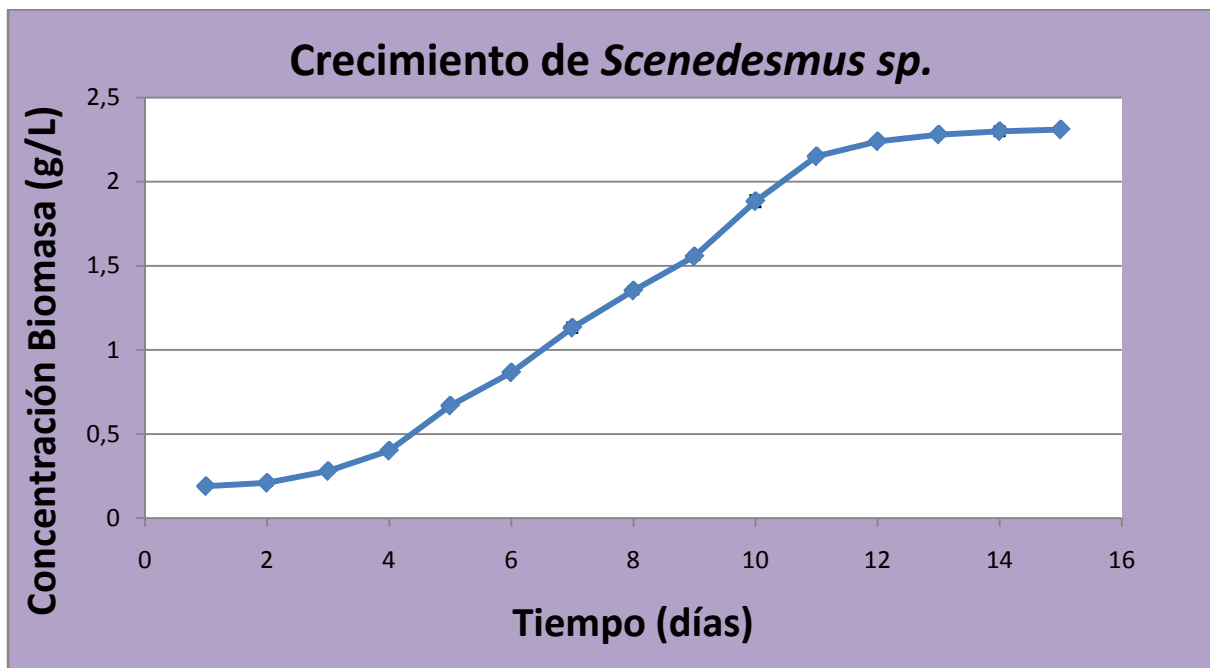
Géneros	Cepas	Ecuación de Regresión	R <sup>2</sup>
<i>Chlorella sp.</i>	788	$y = 1,254x$	0,998
<i>Scenedesmus sp.</i>	784	$y = 1,620x$	0,990

En cuanto a las curvas de crecimiento, ambas cepas presentaron un crecimiento con una tendencia similar a lo largo del ensayo, mostrando una curva típica de crecimiento tal y como se muestra en las Figuras 4.4 y 4.5, con una fase de acondicionamiento de unos 4 días, fase exponencial de unos 8 días, seguida de una amplia fase estacionaria que prácticamente finalizó al final del ensayo. Si el ensayo se hubiese alargado, lo normal es que a los pocos días muestre un descenso con respecto a la concentración de biomasa, debido a la limitación de nutrientes que provoca la muerte celular y el medio de cultivo va perdiendo esa coloración verde oscura característica de las clorofilas microalgales.

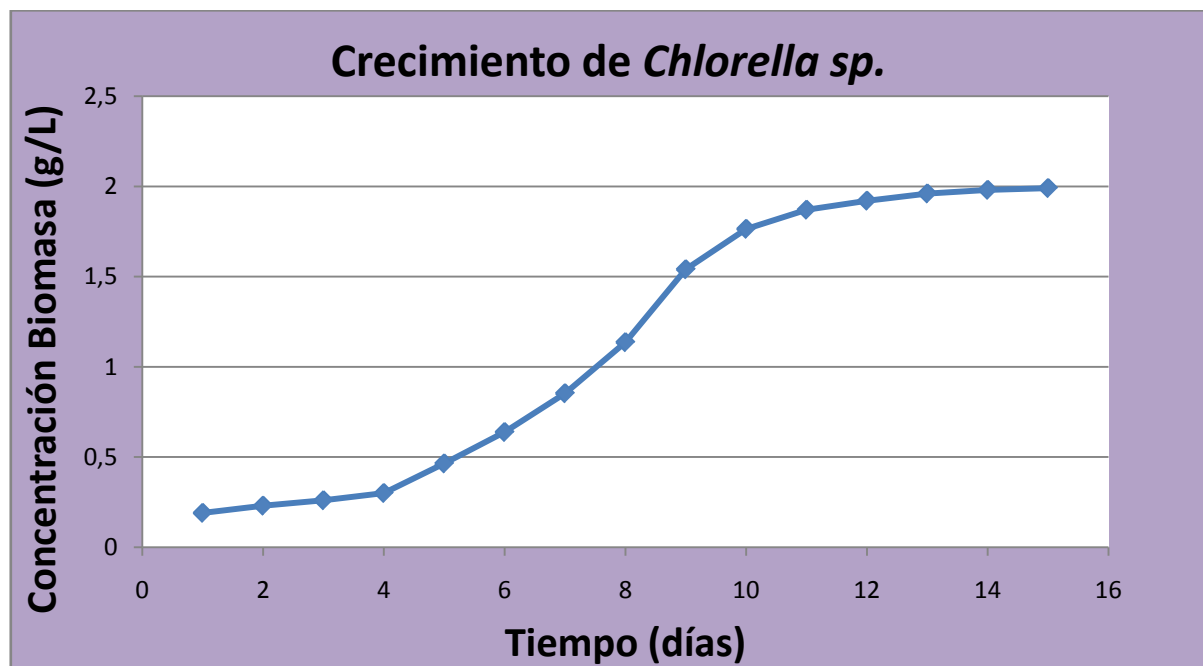
La mayor concentración de biomasa y el valor más alto de productividad al final del ensayo se presentó en la cepa 784 perteneciente al género *Scenedesmus sp.*, con 2,31 g/L y 0,151 g/Ld, a los 15 días de incubación, aunque la cepa 788 perteneciente a *Chlorella sp.*, también mostró buenos resultados, con 1,99 g/L y 0,129 g/Ld, en el mismo periodo de incubación.

La mas alta velocidad especifica de crecimiento máxima se registró en la cepa 788, reflejándose en el tiempo de duplicación de la microalga, el cual es menor en la misma cepa, tal y como se muestra en la Tabla 4.2.

**Figura 4.4.** Curva de crecimiento de la cepa 784 perteneciente al género *Scenedesmus sp.*, mantenida en un sistema estático en medio estándar según Becker (1995).



**Figura 4.5.** Curva de crecimiento de la cepa 788 perteneciente al género *Chlorella*, mantenida en un sistema estático en medio estándar según Becker (1995).





**Tabla 4.2.** Concentración de biomasa, productividad, velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), y tiempo de duplicación celular ( $T_d$ ) de las cepas 788 y 784 en el medio de cultivo estándar según Becker (1995)

Parámetros de Crecimiento	Cepa 788	Cepa 784
<b>Biomasa (g/L)</b>	1,92 $\pm$ 0,008	2,24 $\pm$ 0,015
<b>Productividad (g/Ld)</b>	0,157	0,186
<b><math>\mu</math> (d<sup>-1</sup>)</b>	0,296	0,203
<b><math>T_d</math> (d)</b>	2,34	3,41

La concentración de biomasa alcanzada en este trabajo con respecto a la cepa 784, es mayor a la reportada por Kim et al, 2007, donde se cultiva la misma microalga en el medio de cultivo KEP I con aireación constante, presentando un crecimiento de 0,197 g/L, al igual que las concentraciones reportadas por Greque y Vieira, 2007, donde se obtienen 1,800 g/L de *Scenedesmus obliquus* cultivada en tres fotobiorreactores en serie de 2 L de capacidad, suministrándole CO<sub>2</sub> constantemente.

En otro trabajo realizado por Quevedo et al, 2007, donde cultivan *Scenedesmus* sp., en tres medios de cultivo diferentes en sistemas discontinuo, también presentan concentraciones inferiores, donde obtienen 0,317, 0,408 y 0, 195 en cada uno de ellos respectivamente, en un ensayo que duró 30 días.

Algunos autores presentan rangos amplios de velocidades específicas de crecimiento; tal es el caso de Martínez *et al*, en el año 2000, quienes presentan velocidades específicas de crecimiento entre 1,08 d<sup>-1</sup> y 4,56 d<sup>-1</sup> con medios de cultivo preparados con efluentes de tratamiento secundario y un suministro continuo de CO<sub>2</sub>. Hodaifa *et al*, 2007, obtuvieron valores de de 1,056 d<sup>-1</sup>, con adición de CO<sub>2</sub> por aireación, y Quevedo et al, 2007, donde cultivan la microalga *Scenedesmus* sp., en medio ALGAL a 25 °C presentan una velocidad específica de crecimiento máxima de 0,864 d<sup>-1</sup>.

Otros autores muestran valores menores al reportado en este trabajo con respecto a la cepa 784, para la velocidad específica de crecimiento; tal es el caso de Greque y Vieira, 2007, al emplear *Scenedesmus obliquus* cultivada en Erlenmeyer a una temperatura de 30 °C, donde se obtiene  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,18 d<sup>-1</sup>.

El cultivo de *Chlorella sp.*, presentó una mejor cinética de crecimiento en comparación con la cepa 784, mostrando una velocidad específica de crecimiento de 0,296 d<sup>-1</sup> y tiempo de duplicación de 2,34 días. Con respecto a otros trabajos relacionados con el cultivo de *Chlorella sp.*, hay algunos que superan estos valores, como el realizado por Robles, 2003, en su Proyecto Fin de Carrera que obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0,7 d<sup>-1</sup> y productividad de biomasa máxima de 1,49 g/Ld, al cultivar *Chlorella sp.*, en un reactor helicoidal en sistema discontinuo, en un ensayo que duró 12 días.

En contraposición a este ejemplo, hay otro estudio en el que se obtienen valores muy parecidos a los obtenidos en este trabajo, como el ensayo realizado por Greque y Vieira, 2007, con valores de  $\mu_{\text{máx}} = 0.31 \text{ d}^{-1}$  y  $T_d = 2.27 \text{ d}$  al cultivar *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor tubular de 4 litros de capacidad a una temperatura de 30 °C.

En términos generales, los resultados de este trabajo muestran cinéticas de cultivo cortas y concentraciones de biomasa aceptables. Las productividades obtenidas en esta investigación son aceptables comparadas con valores reportados por otros investigadores, pero si se compara con sistemas de cultivo en continuo y semicontinuo, las productividades son mayores que para un cultivo por lotes. La productividad obtenida por Robles, 2003 fue de 2,09 g/Ld al cultivar *Chlorella sp.*, en continuo en modo quimiostato, sin embargo Nuñez *et al.*, en el año 2001 reportan productividades de 0,154 g/Ld en quince días de cultivo semicontinuo, valores próximos a los obtenidos en este trabajo, y en particular a la cepa 784.

#### 4.4. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE CHLORELLA EN PURINES

El residual porcino utilizado en el ensayo presentaba una apariencia bastante turbia con un color marrón oscuro y olor fuerte que fue disminuyendo gradualmente en el transcurso del mismo. Los olores desagradables en este tipo de residuales se deben a la presencia de bacterias anaerobias productoras de ácido sulfhídrico, influyendo en su proliferación un bajo contenido en oxígeno disuelto y pH disminuido. Al final del ensayo desapareció el fuerte olor y la coloración marrón se torno a verde oscuro, demostrando que *Chlorella sp.*, logró adaptarse a las condiciones de cultivo y a las elevadas temperaturas diurnas de  $30\pm 4^{\circ}\text{C}$ , siendo además efectiva en la generación de oxígeno necesario para la presencia de bacterias aerobias que degradan la materia orgánica (Oswald, a y b, 1988).

Es importante señalar que en todo momento se observó un cultivo monoalgal, es decir, a pesar de que los purines no fueron esterilizados, estos pueden contener especies de microalgas o cianobacterias contaminantes, lo cual es una ventaja competitiva para estos cultivos. No obstante se mantuvo la flora bacteriana asociándose a la microalga.

El crecimiento obtenido utilizando el residual porcino sugieren que puede ser usado como fuente de nutrientes para la producción de biomasa de *Chlorella sp.*, estableciéndose como alternativa frente al medio de cultivo comercial; con lo cual se estarían reduciendo los costes de producción y mejorando la eficiencia de la utilización de purines, como fuente de nutrientes para el crecimiento de microalgas de interés económico.

#### 4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PURINES

El análisis químico de los purines, muestra valores para el nitrógeno, fósforo y potasio mucho más elevados que las cantidades proporcionadas en el medio de cultivo artificial, por tanto no debería haber problemas de limitación para el cultivo de microalgas en cuanto a nutrientes. El valor obtenido de DQO en el residual fue de 27.558 g/L, considerándose una

excelente fuente de carbono para cultivo de microalgas, pues la materia orgánica que aporta es muy alta, necesitando pequeños volúmenes del residual para satisfacer los requerimientos de producción de biomasa (1,2 g de DQO por gramo de biomasa).

**Tabla 4.3.** Parámetros químicos de los purines y medio de cultivo estándar empleado.

Parámetros	Medio Estándar	Purines
<b>Nitrógeno total</b>	0,195 g/L	2,60 g/L
<b>Fósforo total</b>	0,031 g/L	0,31 g/L
<b>Potasio</b>	0,32 g/L	1,41 g/L
<b>DQO</b>	-	27.558 g/L
<b>DBO<sub>5</sub></b>	-	1.896 g/L

## 5. CONCLUSIONES

- Es factible ambientalmente eliminar la contaminación que provocan los purines, obteniéndose agua de calidad para riego agrícola o jardines.
- El procedimiento de cultivo usado ha sido el más barato, siendo el siguiente paso a realizar, el cultivo de microalgas con purines en un sistema Race-Way.
- La contaminación bacteriana no es un problema, puesto que consumen el oxígeno producido por las microalgas y descomponen la materia orgánica de los purines produciendo dióxido de carbono, amonio y fosfato que son asimilados por las microalgas. En cuanto a su empleo en alimentación animal, existen diferentes técnicas de esterilización, eliminando el problema de la contaminación bacteriana y microalgal.
- No es necesario emplear sistemas de cultivo sofisticados. Además los sistemas Race-Way tienen la ventaja de presentar una gran superficie expuesta al aire libre y a la radiación solar, proporcionando el oxígeno necesario a los purines para reducir su contaminación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C.** 1995. MICROALGAS: Cultivo y Aplicaciones. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Coruña, Coruña, España.
- Andrew DE, Clesceri LS, Greenberg AE.,** 1995. Standard methods. For the examination of water and wastewater. 16 ed. [New York?]:AWWA/WPCF/APHA., 512-715.
- Bailey JE, Ollis DF.,** 1986. Biochemical engineering fundamentals, 2nd ed. McGraw-Hill, Singapore
- Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo.,** 2006. Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Taylor & Francis group. 301 páginas.
- Bartos y Conde.,** 1978. Determinación rápida de la demanda química de oxígeno. Sobre los derivados de la caña de azúcar. ICIDCA., 12(3):12-7.
- Becker, E.W.,** 1995. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge, Great Britain.
- Beijerinck, M.W.** 1890. Kulturversuche mit Zoochlorenllen, Linchenengoniden und anderen niederen Algen. *Bot. Zeitung.* 48: 725.
- Belcher, H., Swale, E.,** 1988. Culturing algae. In: A Guide for Schools and Colleges, CCAP. Wilson and Son Ltd., London, UK.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J.,** 1988. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Butterwick, C.; Heaney, S.I. and Talling, J.F.,** 1982. A comparison of Eight Methods for Estimating the Biomass and Growth of Planktonic Algae, *Br. Phycol. J.*, 17: 69-79.
- Chacón, C.; Andrade, C.; y Morales, E.,** 2004. “Producción de Biomasa de la Microalga *Scenedesmus* sp., en Cultivo Masivo y a Cielo Abierto”. X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Maracaibo, Estado Zulia. Venezuela. 115pp.
- Chacón, C.; Andrade, C.; Cardenas, C., Araujo, I., y Morales, E.,** 2006. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *SciELO*, 38: 1-13.
- Charity, E., Andrade, R., Alexandra, L., Vera, B., Carmen, H., Cárdenas, L., Ever, D., Morales, A.,** 2009. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Rev. Téc. Ing. Universidad de Zulia.* Vol. 32, Nº 2: 126 – 134.
- De la Noüe, J., Prouix, D.,** 1988. Biological tertiary treatment of urban waste with chitosan immobilized *Phormidium*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 29, 292–297.
- Finlayson, M., Chick, A., von Oertzen, I., Mitchel, D.,** 1987. Treatment of piggery effluents by an aquatic plant filter. *Biol. Wastes* 19, 179–196.
- González L., Cañizales R. y Baena S.,** 1997. “Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombial Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*”. *Bioresource Technology* Vol.60, 259-262.

- González P.**, 2006. Desarrollo de productos para las panaderías y productos materno infantiles. Disponible en: <http://www.wishh.org>. Organizacion wishh (World initiative for soy in human health).
- Greque M, Vieira JA.**, 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.*, and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol*; 129: 439–445.
- Hamer, G.**, 1985. Microbiology of treatment processes. In: *Comprehensive Biotechnology*, 4th ed. Pergamon Press, pp 819–833.
- Harder, R. & Von Witsch, H.** 1942. Über Massenkultur von diatomeen. *Ber. Bot. Ges.* 60: 142.
- Hodaifa G, Martinez M, Sanchez S.**, 2007. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol*; 99(5): 1111 – 1117.
- Kayombo, S., Mbwette, T.S.A., Katima, J.H.Y., Jorgensen, S.E.**, 2003. Effect of substrate concentration on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. *Water Res.* 37 (12), 2937–2943.
- Kim MK, Park JW, Park CS, Kim SJ, Jeune KH, Chang MU, et al.**, 2007. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technol*; 98: 2220 – 2228.
- Langdon, C.J. & Waldock, M.J.** 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 61: 431-448.
- Lavoie, A., de la Noüe, J.**, 1985. Hyper-concentrate culture of *Scenedesmus obliquus* a new approach for wastewater tertiary treatment. *Water Res.* 19, 1437–1442.
- Lembi, C.A., Waaland, J.R.**, 1988. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. In: *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 251–281.
- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Cordero-Esquivel, B. y Nieves-Soto, M.** 2003a. Producción comercial de larvas de camarón y microalgas en cuatro estados de la República Mexicana. *Biotecnia*, 5 (1): 42-50.
- Martínez, M.E., Jimenez, J.M., El Yousfi, F.**, 1999. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 67 (3), 233–240.
- Melinda, J., Griffiths, Clive Garcin, Robert P., van Hille, Susan T.L., Harrison.** 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119–123.
- Núñez V, Voltolina D, Nieves M, Pina P, Medina A, Guerrero M.**, 2001. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technol*; 78: 161-164.

- Ogbondeminu, F.S., Okoye, F.C.,** 1992. Microbiological evaluation of an untreated domestic wastewater aqua-culture system. *J. Aquat. Trop.* 7 (1), 27–34.
- Oswald, W.J.,** 1955. Photosynthesis in sewage treatments. *J. San. Eng. Div.* 81, 321–329.
- Oswald, W.J.** 1988. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). En Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L. J. (eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. pp. 357-394.
- Oswald, W.J.** 1988a. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. In: Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (eds.): *Algae and Human affairs*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 255-281.
- Oswald, W.J.** 1988b. Microalgae and waste water treatment. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.): *Micro-algae Biotechnology*. Cambridge University Press, N.Y., pp. 305-328.
- Palmer, C.M.,** 1977. Algae in sewage stabilization ponds. In: Lewis, R.L. (Ed.), *Algae and Water Pollution, USA*, pp. 46–50.
- Probert, V. y Klass, C.** 1999 Some Technical for Culture collections. *Journal of General and Applied Microbiology*. pp 150-52.
- Quevedo, C; Morales, S.P; Acosta, A.,** 2008. Crecimiento de *Scenedesmus sp.*, en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal, *Vitae*, vol. 15, núm. 1, enero, 2008, pp. 25-31
- Ramallo, R.S.,** 1983. *Introduction to Wastewater Treatment Processes*, 2nd ed. Academic Press, New York, USA.
- Richmond, A.** 1986. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 528 pp.
- Richmond, A.,** 1988. A prerequisite for industrial microalgae culture: efficient utilization of solar irradiance. In: *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, Barking, UK, pp. 237–244.
- Robles, J.M.** 2003. Evaluación de un proceso de producción de microalgas para uso en acuicultura. Almería. España, Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Almería.
- Romero, T.; Miyashita, H. y Kurano, N.,** 2000. “Crecimiento y composición bioquímica de *Chlorella sp.* cultivada en residual pesquero”. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, Vol. 34 No2, 93-100.
- Rosales N., Bermúdez J., Moronta R. y Morales E.,** 2007. “Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol.9 No1, 41-48.
- Schmidell W, Lima AU, Aquarone E, Borzani W.,** 2001. *Biotecnologia Industrial*, vol 2. Edgard Blücher, Saõ Paulo, ISBN 85-212-0279-2
- Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (eds).** 1989. *Bergey`s manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3: 1710-1806. Williams & Wilkins, Baltimore.

- Tam, N. y Wong, Y.,** 1990. "The Comparison of Growth and Nutrient Removal Efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in Settled and Activated Sewage". Environmental Pollution. Vol. 65 (1990) 93-108.
- Travieso, L.,** 1979. Microalgae culture on pre-treated piggery waste. MSc Thesis. IPSJAE-British Columbia University Agreement, La Habana, Cuba.
- Travieso, L., Benítez, F.,** 1982. Unicellular microalgae growth on Swine Waste. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Ganado Porcino 5 (3), 89–99.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A., Colmenarejo, M.F.,** 2006. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. Ecological Engineering 28: 158–165.
- Voltolina D., Gómez H. y Correa G.,** 2004. "Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater under a simulated daylight cycle". Vie Milieu, Vol. 54 No1, 21-25.
- Vonshak, A.** 1988. Microalgas: técnicas de cultivo en laboratorio y para producción de biomasa a la intemperie. p. 155- 165. En Coombs, J., May, D.O., Long, S.P. y Scurlock, J.M. (eds.) Técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad. Colegio de Graduados, Chapingo, Estado de México, México, 258 pp.
- Vonshak, A.,** 1993. Microalgae: laboratory growth techniques and the biotechnology of biomass production. In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamps, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual. Chapman and Hall, London, UK (Chapter 21).
- Zhang, X.W., Chen, F., Johns, M.R.,** 1999. Kinetic model for heterotrophic growth of *Clamydomonas reinhardtii* in batch and fed-batch cultures. Process. Biochem. 35 (3–4), 285–289.